

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PATHOLOGIE  
PROF. DR. FERDINAND HOFSTÄDTER  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Vergleich des *KRAS/BRAF*-Mutationsstatus zwischen  
Primärtumoren und Metastasen kolorektaler Karzinome**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Alexander Kiesl

2014



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PATHOLOGIE  
PROF. DR. FERDINAND HOFSTÄDTER  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Vergleich des *KRAS/BRAF*-Mutationsstatus zwischen  
Primärtumoren und Metastasen kolorektaler Karzinome**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Alexander Kiesl

2014

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Dietmaier

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Pompiliu Piso

Tag der mündlichen Prüfung: 25. September 2014

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Epidemiologie .....	1
1.2 Ätiologie und Risikofaktoren.....	2
1.3 Karzinogenese .....	3
1.4 Metastasierung .....	5
1.5 Klassifikation des kolorektalen Karzinoms .....	6
1.6 EGFR-Signalweg .....	7
1.7 <i>KRAS</i> und <i>BRAF</i> im Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg .....	8
1.8 <i>KRAS</i> und <i>BRAF</i> in malignen Tumoren.....	9
1.9 <i>RAS (KRAS/NRAS)</i> und <i>BRAF</i> in kolorektalen Karzinomen .....	10
1.10 Zielsetzung der Arbeit .....	13
<b>2 Materialien.....</b>	<b>14</b>
2.1 Chemikalien .....	14
2.2 Kits .....	15
2.3 Geräte .....	15
2.4 Verbrauchsmaterialien .....	17
2.5 Software .....	18
2.6 Lösungen.....	18
2.6.1 Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese.....	18
2.6.2 Peg-Mix .....	18
2.7 Oligonukleotide.....	19
2.7.1 Primer für <i>KRAS/BRAF</i> -Mutationsanalyse am PyroMark Q24 .....	19
2.7.2 Primer für die Sequenzierung nach Sanger – <i>KRAS</i> Kodon 12 und 13.....	19
<b>3 Methoden .....</b>	<b>20</b>
3.1 DNA-Isolierung aus Patientengewebe .....	20
3.1.1 Mikrodisektion.....	20
3.1.2 Lasermikrodisektion .....	21
3.1.3 DNA-Isolierung mittels MagNa Pure LC .....	22

3.1.4	DNA-Isolierung mittels Puregene Tissue Core Kit A .....	23
3.2	DNA-Konzentrationsbestimmung .....	23
3.2.1	DNA Aufkonzentrierung .....	24
3.3	Mutationsanalyse des Exons 2 (Kodon 12 und 13) des <i>KRAS</i> -Gens mittels ABI Prism™ 3100 Genetic Analyser .....	24
3.3.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	24
3.3.2	Gelelektrophorese von DNA .....	25
3.3.3	PEG-Fällung .....	26
3.3.4	Konzentrationsbestimmung .....	26
3.3.5	Sequenzierung mittels Didesoxymethode nach Sanger .....	27
3.4	Mutationsanalyse des Exons 2 (Kodon 12 und 13) und Exon 3 (Kodon 61) des <i>KRAS</i> -Gens und des Exon 15 (Kodon 600) des <i>BRAF</i> -Gens mittels PyroMark .....	28
3.4.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR) für Mutationsanalyse mittels Pyrosequenzierung .....	29
3.4.2	Prinzip der Pyrosequenzierung .....	29
3.4.3	Vorbereitung für den PyroMark Q24 .....	31
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>32</b>
4.1	Patientengut .....	32
4.1.1	Tumorstadium .....	32
4.1.2	Nodalstatus .....	33
4.1.3	Fernmetastasen .....	34
4.1.4	Lokalisation der Primärtumoren .....	35
4.1.5	Differenzierungsgrad .....	35
4.1.6	Altersverteilung .....	36
4.1.7	Zustand nach Radiochemotherapie .....	36
4.1.8	Metastasenverteilung .....	37
4.1.9	Synchrone und metachrone Metastasen/Zweittumoren .....	40
4.2	<i>KRAS</i> und <i>BRAF</i> Mutationsanalyse .....	41
4.2.1	Häufigkeit der <i>KRAS</i> -Mutation in Primärtumoren .....	41
4.2.2	Häufigkeit der <i>KRAS/BRAF</i> -Mutation in Primärtumoren .....	43
4.2.3	Vergleich der <i>KRAS</i> - und <i>BRAF</i> -Mutation zwischen Primärtumoren und Metastasen .....	44
4.2.4	Vergleich des <i>KRAS</i> - und <i>BRAF</i> -Mutationsstatus von Metastasen .....	45
4.2.5	Diskrepante Fälle .....	48
4.2.6	Lasermikrodissektion .....	51
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>55</b>

---

5.1	<i>KRAS</i> - und <i>BRAF</i> -Mutationshäufigkeit .....	56
5.2	<i>KRAS</i> - und <i>BRAF</i> - Mutationstatus: Tumor versus Metastase.....	60
5.2.1	Tumorheterogenität .....	62
5.3	Mikrodissektion .....	65
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>69</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>89</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>90</b>

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Adenom-Karzinom-Sequenz .....	4
Abbildung 2: Lasermikrodissektion mittels Palm® Micro Beam von Zeiss.....	22
Abbildung 3: Agarose-Gelelektrophorese .....	26
Abbildung 4: Chromatogramm einer Sequenzierung .....	27
Abbildung 5: Prinzip der Pyrosequenzierung .....	30
Abbildung 6: Lymphknotenmetastase .....	38
Abbildung 7: Lebermetastase .....	39
Abbildung 8: Lungenmetastase .....	39
Abbildung 9: Peritonealkarzinose .....	40
Abbildung 10: Verteilung der <i>KRAS</i> -Mutationen in Primärtumoren .....	42
Abbildung 11: Übersicht der Anzahl übereinstimmender und diskrepanter Fälle .....	44
Abbildung 12: Chromatogramm Tumor ID 60 .....	49
Abbildung 13: Pyrogramm Tumor und Metastase ID 60 .....	49
Abbildung 14: Pyrogramm: Tumor und Metastasen ID 101 .....	50
Abbildung 15: Tumorzellareal .....	51
Abbildung 16: Markiertes Tumoreal .....	52
Abbildung 17: Abladiertes Tumoreals .....	53
Abbildung 18: Pyrogramm nach manueller und Lasermikrodissektion .....	54



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: 5-Jahresüberleben nach UICC-Stadium .....	6
Tabelle 2: Verteilung des Tumorstadiums (pT1-pT4).....	33
Tabelle 3: Verteilung des N-Status.....	33
Tabelle 4: Verteilung des M-Status.....	34
Tabelle 5: Verteilung der Primärtumoren.....	35
Tabelle 6: Verteilung des Differenzierungsgrades (Grading) .....	36
Tabelle 7: Alter zum Zeitpunkt der Diagnose .....	36
Tabelle 8: Z.n. Radiochemotherapie .....	37
Tabelle 9: Verteilung der Metastasen.....	38
Tabelle 10: Zeit bis zur Diagnose Metastase/Zweittumor.....	41
Tabelle 11: Verteilung der <i>KRAS</i> -Mutationen in Primärtumoren .....	42
Tabelle 12: Verteilung der <i>KRAS/BRAF</i> -Mutationen in Primärtumoren .....	43
Tabelle 13: McNemar-Test: Mutationsstatus (Tumor versus Metastase) .....	45
Tabelle 14: Anzahl verschieden lokalisierter und korrespondierender Metastasen ...	46
Tabelle 15: Übersicht der übereinstimmenden Metastasen mit Primärtumor .....	46
Tabelle 16: Übersicht der Tumoren mit mindestens zwei Vergleichspaaren.....	47

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
APC	Adenomatous polyposis coli
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaaren
<i>BRAF</i>	B (Isoform B1) rat fibrosarcoma
CCD	Charge-coupled Device
DCC	deleted in colorectal carcinoma
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	Elektronische Datenverarbeitung
et al.	und andere
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
for	forward, vorwärts
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HNPCC	hereditäres nicht polypöses kolorektales Karzinom
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ID	Identifikationsnummer
inkl.	inklusive
kDa	Kilodalton
<i>KRAS</i>	Kirsten rat sarcoma
KRK	kolorektales Karzinom
min.	Minuten
Mut	Mutation
n	Anzahl
PCR	PolymeRAskettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol

PPi	Pyrophosphate
rev	reverse, rückwärts
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
syn.	Synonym
TAE	Tris Acetat EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TP 53	Tumor Protein 53
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolettes Licht
vgl.	vergleiche
Wt	Wildtyp

Chemische Elemente, SI-Einheiten und physikalische Größen werden entsprechend den internationalen Richtlinien verwendet.

# 1 Einleitung

Als Tumor (*Syn.: Geschwulst, Neoplasma, Neoplasie*) werden abnorme Gewebemassen bezeichnet, die durch fortschreitende Vermehrung von körpereigenen entarteten Zellen entstehen. Bei dem Entstehungsprozess von Tumoren handelt es sich, auf molekularer Ebene, um Regulationsstörungen von Genen, die vor allem Wachstum (Proliferation), programmierten Zelltod (Apoptose) und Differenzierung von Zellen kontrollieren.

Das kolorektale Karzinom oder KRK (kolorektales Karzinom) ist eine bösartige epitheliale Neubildung (Krebs) des Dick- und Mastdarms.

## 1.1 Epidemiologie

Der Darm ist sowohl bei Männern als auch bei Frauen die dritthäufigste Tumorlokalisation und das kolorektale Karzinom gehörte im Jahr 2008 zu den zweithäufigsten krebsbedingten Todesursachen in Deutschland. Neben den Tumoren in der Prostata bei Männern und der Brustdrüse bei den Frauen, gehört das kolorektale Karzinom damit zu den häufigsten malignen Tumoren in Deutschland. Mit fortschreitendem Alter steigt die Erkrankungswahrscheinlichkeit. Im Jahr 2008 lag mehr als die Hälfte der betroffenen Patienten über dem 70. Lebensjahr und etwa 10% erkrankten vor dem 55. Lebensjahr (Robert Koch-Institut, 2012).

Seit dem Jahr 2002 existiert in Deutschland ein Darmkrebs-Screening Programm für Männer und Frauen. Dieses sieht ab dem 50. Lebensjahr ein Beratungsgespräch sowie einen Test auf occultes (nicht sichtbares) Blut im Stuhl sowie ab dem 55. Lebensjahr eine Koloskopie mit Wiederholung alle 10 Jahre vor (Riemann & Webendorfer, 2012). Diese Screeningmethoden dienen zum einen der Früherkennung, zum anderen bietet die Koloskopie die Möglichkeit der Verhütung von Darmkrebs durch Abtragung fortgeschrittener Adenome, die im Median nach 10 Jahren eine klinisch manifeste Krebserkrankung bedeuten würden (Sailer, 2012).

## 1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Beim dem Großteil der kolorektalen Karzinome geht man von einer multifaktoriellen Genese ohne familiäre Häufung aus. Diese Tumore werden als sporadisch auftretende Karzinome bezeichnet. Als Risikofaktoren gelten ein westlicher Lebensstil mit geringer körperlicher Bewegung, Adipositas, fleischreicher Ernährung, Alkohol- und Zigarettenkonsum (Lieberman DA, 2003). Hohes Lebensalter und das Geschlecht zeigen sich als weitere Risikofaktoren. Man konnte nachweisen, dass 45-jährige Männer das gleiche Risiko für ein Karzinom haben wie 10 Jahre ältere Frauen (Kolligs et al., 2011). Vor allem steigert das Vorhandensein eines metabolischen Syndroms und Diabetes mellitus das Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken um 50% (Kahi et al., 2008).

Neben den sporadischen kolorektalen Karzinomen, die 80-85% der Fälle ausmachen und auf dem Boden der Adenom-Karzinom-Sequenz entstehen, sind etwa 10% hereditär bedingt. Weitere 5% entstehen im Rahmen von entzündlichen Darmerkrankungen (Boese-Landgraf, 1998).

Zu den beiden Hauptformen der hereditären Kolonkarzinome zählen FAP (familiäre adenomatöse Polyposis) und HNPCC (hereditäres nicht polypöses kolorektales Karzinom, auch Lynch-Syndrom).

Die FAP ist eine erbliche Erkrankung die nach der Mendelschen Regel über einen autosomal-dominanten Erbgang vererbt wird. In  $\frac{1}{4}$  der Fälle liegt bei den betroffenen Patienten eine Neumutation vor (Bisgaard et al., 1994). Dieser Erkrankung liegt eine Keimbahnmutation des Adenomatous Polyposis coli-Gens (*APC*-Gen) zugrunde und führt zu multiplen kolorektalen Adenomen, die sich im mittleren Alter von 36 Jahren zu einem Kolonkarziom entwickeln (Bülow, 1986).

Das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC) wird ebenfalls autosomal-dominant vererbt und zeigt eine Auftretenswahrscheinlichkeit bei betroffenen Genträgern von 80% (H. T. Lynch et al., 1993). Bei dieser Erkrankung spielen Mutationen in Mismatch Repair Genen eine Rolle, die zu DNA-

Sequenzlängendifferenzen zwischen Tumor und Normalgewebe führen und dessen Auftreten als Mikrosatelliteninstabilität bezeichnet wird (H. Kim et al., 1994; Chung & Rustgi, 2003). Da sich das HNPCC erst einmal nicht vom sporadischen Karzinom unterscheidet, wurden diagnostische Kriterien festgelegt, die als Amsterdam Kriterien bezeichnet werden (Vasen et al., 1999).

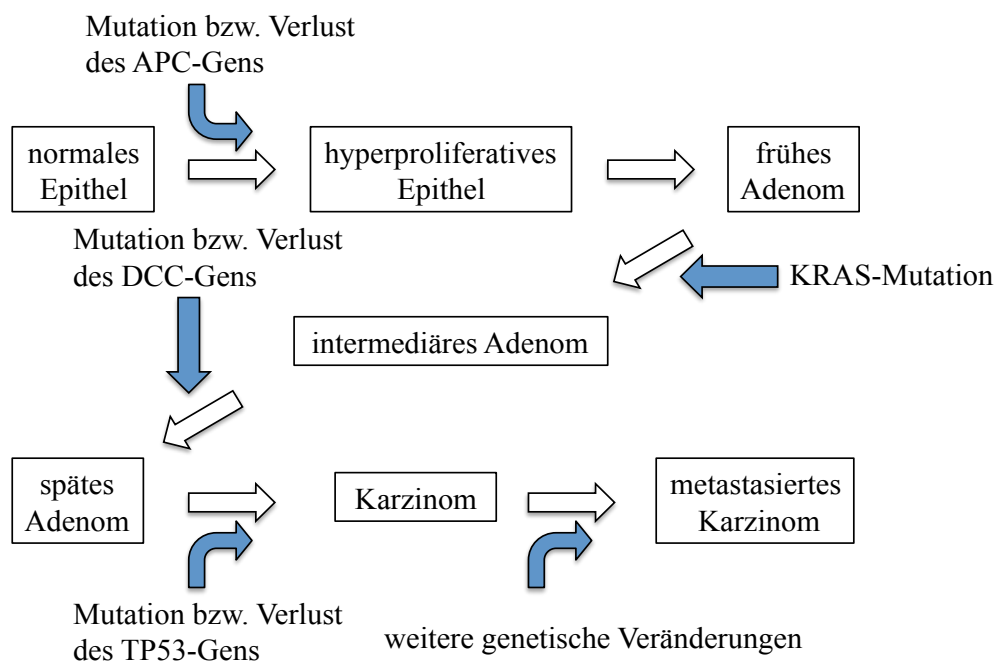
### **1.3 Karzinogenese**

Das kolorektale Karzinom entwickelt sich in der Regel auf dem Boden von Adenomen, die sich als gutartige Geschwulst der Darmschleimhaut als breitbasiger oder gestielter Polyp in das Darmlumen vorwölben. Diese Adenome stellen die Vorläuferläsionen der Karzinome dar und entwickeln sich im zeitlichen Rahmen von Monaten bis Jahren zu Adenokarzinomen (B. Levin et al., 2008). Die Entwicklung vom Adenom zum Karzinom ist bedingt durch die Anhäufung von genetischen Veränderungen (J. P. Lynch & Hoops, 2002). Das Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz (Muto et al., 1975) beschreibt die fortschreitende Entwicklung von proliferativer Schleimhaut über das Adenom bis hin zum Karzinom. Mit dieser histologischen Sichtweise verknüpften Fearon & B Vogelstein (1990) Mutationen in verschiedenen Genen.

In dieser schrittweisen Entwicklung von Normalgewebe zum Karzinom ereignen sich genetische Veränderungen in sogenannten Onkogenen und Tumorsuppressorgenen. Diese genetischen Veränderungen innerhalb einer Zelle ermöglichen dieser einen Zugewinn an Wachstum und Invasivität (Fearon & B Vogelstein, 1990). Als erster Schritt in dieser Entwicklung wird der Funktionsverlust des *APC*-Gens auf Chromosom 5q21 beschrieben, der in 80% der sporadischen Karzinome nachweisbar ist (K. J. Smith et al., 1993; Kenneth W Kinzler & Bert Vogelstein, 1996). Das APC-Protein als Tumorsuppressorgen ist in der Regulation von  $\beta$ -Catenin (Bestandteil von Zelladhäsionsmolekülen und Signalmolekül) beteiligt (Morin et al., 1997; Klaus & Birchmeier, 2008), dass ein Bestandteil des Wnt-Signalweges ist.

Als wichtiger Schritt in der Karzinogenese hat sich die Aktivierung des Protoonkogens *KRAS* herausgestellt (K Forrester et al., 1987; Pretlow et al., 1993).

Abhängig von der Größe wurden Mutationen in bis zu 50% der kolorektalen Adenome gefunden (B Vogelstein et al., 1988). In Adenomen findet man neben Mutationen im *KRAS*-Gen auch häufig Mutationen im Onkogen *BRAF*, welches im gleichen Signalweg eine Rolle spielt (Beach et al., 2005). Darüber hinaus deuten Studien darauf hin, dass sich Mutationen im *KRAS*- und *BRAF*-Gen im gleichen Tumor gegenseitig ausschließen (Jolien Tol et al., 2009; Rajagopalan et al., 2002a; F Loupakakis et al., 2009). Mutationen im *KRAS*-Gen wurden auch in normaler Kolonschleimhaut gefunden und scheinen daher erst in Verbindung mit Mutationen im *APC*-Gen den betroffenen Zellen einen Selektionsvorteil zu bieten (Minamoto et al., 1995; Zhu et al., 1997). In Normalgewebe verhalten sich Mutationen im *KRAS*-Gen eher neutral (M. Ilyas et al., 1999).



**Abbildung 1: Adenom-Karzinom-Sequenz.** Modifizierte Abbildung des genetischen Modells der kolorektalen Tumorentstehung nach Fearon & B Vogelstein (1990).

Durch Anhäufung weiterer genetischer Veränderungen, wie der Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen, kommt es zur Transformation der späten Adenome zu Karzinomen. Die durch Aneuploidie und chromosomale Instabilität gekennzeichneten Veränderungen betreffen u.a. Gene auf Chromosom 18q wie DCC (*Deleted in Colorectal Carcinoma*) (M. Ilyas et al., 1999). Dabei wird der letzte

Schritt zur Entwicklung eines manifesten Karzinoms durch den Funktionsverlust des auf dem Chromosom 17q lokalisierten Gens TP53 beschrieben (M. Ilyas et al., 1999) (vgl. Abb. 1).

## **1.4 Metastasierung**

Die Metastasierung bzw. die Absiedelung von bösartigem Tumorgewebe in entfernte Organe erfolgt bei kolorektalen Karzinomen entlang drei verschiedener Metastasierungswege. Hierbei unterscheidet man zwischen der Metastasierung per continuitatem, der lymphogenen und der hämatogenen Metastasierung.

Lokal (per continuitatem) breitet sich das Karzinom über die Wandschichten der Kolonschleimhaut aus und infiltriert dabei das perikolische bzw. perirektale Fettgewebe. Im Rahmen dieses Prozesses kann es zur Infiltration in Nachbarorgane kommen.

Die lymphogene Metastasierung tritt bei der Infiltration der Submukosa auf und erfolgt entlang des Lymphabflussgebietes entsprechender Arterien. Bei der Lokalisation des Karzinoms im Colon ascendens und Colon transversum erfolgt die lymphogene Metastasierung entlang der Arteria mesenterica superior und beim Colon descendens entlang der Arteria mesenterica inferior.

Der Einbruch des Tumors in das Blutgefäßsystem kann eine hämatogene Metastasierung zur Folge haben. Entsprechend dem venösen Abflussgebiet, über die Vena cava inferior, findet man Metastasen tiefsitzender Rektumkarzinome häufig im Bereich des nachgeschalteten Kapillarstromgebietes als Lungenmetastasen. Tumore mit der Lokalisation in anderen Kolonabschnitten zeigen häufig Metastasen in der Leber. Hier erfolgt der venöse Abfluss entlang des portalvenösen Abflusses über die Vena portae in die Leber.



## 1.5 Klassifikation des kolorektalen Karzinoms

Nach den Vorgaben der „Union internationale contre le cancer“ (UICC) können Tumoren in Stadien eingeteilt werden. Die Eingruppierung in eine der fünf UICC-Stadien erfolgt mittels TNM-Klassifikation. Die TNM-Klassifikation ist das international anerkannte und verwendete System zur Bestimmung der klinisch und histopathologisch-anatomischen Ausbreitung einer Tumorerkrankung. Die Einstufung des Tumors in die einzelnen Kategorien des TNM-Systems bzw. UICC-Stadien erlaubt prognostische Aussagen und bestimmt die weitere Therapie.

Dabei beschreibt das T (Tumor) die Größenausdehnung des Primärtumors, N (Nodus) den Status der regionären Lymphknotenmetastasen und M (Metastase) den Status in Bezug auf die Metastasen.

Die Angabe der TNM-Klassifikation kann entweder prätherapeutisch auf Grundlage von klinischen Untersuchungen cTNM (*c = clinical*) bzw. der Ultraschalldiagnostik uTNM (*u = Ultraschall*) erfolgen oder postoperativ durch die histopathologische Aufarbeitung im Rahmen der pathologischen Diagnostik pTNM (*p = pathologische Klassifikation/postoperative histopathologische Klassifikation*).

Die TNM-Klassifikation dient als ein zuverlässiger prognostischer Marker für die Überlebensprognose des Patienten. Je höher das Tumorstadium, umso kleiner die Überlebensprognose (vgl. Tabelle 1).

UICC	TNM	Inzidenz	5-JÜ
Stadium I	T1-2, N0, M0	15%	93%
Stadium IIa	T3, N0, M0	30%	85%
Stadium IIb	T4, N0, M0	6%	72%
Stadium IIIa	T1-2, N1, M0	2%	83%
Stadium IIIb	T3-4, N1, M0	17%	64%
Stadium IIIc	jedes T, N0, M0	9%	44%
Stadium IV	jedes T, jedes N, M1	22%	8%

**Tabelle 1: 5-Jahresüberleben nach UICC-Stadium (O’Connell et al., 2004).**

## 1.6 EGFR-Signalweg

Die Signalübertragung von Wachstumsfaktoren (Ligand) erfolgt durch deren Bindung an spezifische Rezeptoren in der Zellmembran der Zielzellen. Zellen, die diese spezifischen Rezeptoren exprimieren reagieren auf dieses Signal und es erfolgt eine Aktivierung von Signalübertragungen innerhalb der Zielzellen. Der EGF-Rezeptor ist einer dieser spezifischen Rezeptoren.

Der EGF-Rezeptor (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) ist ein Transmembranrezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität. Der EGF-Rezeptor gehört zur ErbB-Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen, die aus dem EGF-Rezeptor (auch HER1 oder ErbB-1), ErbB-2 (HER2/c-neu), ErbB-3 (HER3) und ErbB-4 (HER4) bestehen. Der Aufbau des EGF-Rezeptor gliedert sich in eine extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne, einer hydrophoben transmembranen und einer zytoplasmatischen Domäne mit der Tyrosinkinaseaktivität (Holbro & Hynes, 2004).

Dieser Rezeptor spielt u.a. eine Rolle im Rahmen des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung, dem Zellüberleben und der Apoptose (Holbro et al., 2003; Mendelsohn & Baselga, 2006). Die Aktivierung (Dimerisierung) durch einen Liganden wie EGF (*Epidermal Growth Factor*) oder TGF $\alpha$  (*Transforming Growth Factor*) führt zur Umwandlung der inaktiven Rezeptormonomere in einen aktiven Homodimer (Yarden & Schlessinger, 1987). Im Weiteren wird durch die Dimerisierung die intrinsische Tyrosinkinase aktiviert, welche zur Autophosphorylierung intrazellulärer Tyrosinresten führt und damit zur Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden (Oda et al., 2005). Sowohl die Ras-Raf-MEK-ERK- als auch die PI3K-PTEN-AKT-Signalkaskade spielen eine entscheidende Rolle in der Weiterleitung der EGFR Signalübertragung. Besonders spielen sie eine Rolle bezüglich der Regulation von Genexpression und der Vermeidung von Apoptose (McCubrey et al., 2006). Vor allem der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg und die darin enthaltenen Proteine *KRAS* und *BRAF* bzw. deren Gene sind Gegenstand dieser Arbeit.

## 1.7 *KRAS* und *BRAF* im Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg

*KRAS* ist ein kleines G-Protein mit einer molekularen Masse von 21kDa, welches sich in die Gruppe der RAS-Proteine (*Rat sarcoma*) einordnen lässt (Bourne et al., 1991). RAS-Proteine spielen eine Rolle in verschiedenen Signaltransduktionswegen und haben eine Schalterfunktion. Die inaktiven RAS-Proteine haben GDP gebunden. Im Rahmen der Signaltransduktion wird RAS aktiviert und es kommt zum Austausch des gebundenen GDP durch GTP (Boguski & McCormick, 1993). In GTP gebundener Form aktiviert das RAS-Protein die Proteinkinase RAF (*rat fibrosarcoma*) und damit eine Reihe nachgeschalteter Phosphorylierungskaskaden (Schubbert et al., 2007). Durch die intrinsische GTPase-Aktivität der RAS-Proteine erfolgt eine hydrolytische Spaltung des gebundenen GTP zu GDP und führt somit das RAS-Protein in seinen inaktiven GDP gebundenen Zustand zurück. Das aktivierte RAF phosphoryliert darauf die MEK-Kinase, welche ihrerseits die ERK-Kinase aktiviert. Diese Aktivierung der Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade führt letztlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Zellkern (Boguski & McCormick, 1993).

Kommt es zu einer Mutation im *KRAS*-Gen, führt diese zu einem G-Protein, dass ohne einen aktivierenden Liganden wie EGF permanent aktiviert ist. Diese Mutation führt zur gestörten GTPase-Aktivität der RAS-Proteine die somit im aktivierten, GTP gebundenen, Zustand verbleiben (Bos, 1989; Fearon, 1993). Mutationen im *KRAS*-Gen befinden sich zu 90% im Kodon 12 und Kodon 13 sowie in etwa 5% im Kodon 61 des *KRAS*-Gens (Schubbert et al., 2007; Bos, 1989).

Das *BRAF*-Gen kodiert für eine Serin/Threonin-spezifische Proteinkinase (Kolch, 2000). Wie bereits oben beschrieben, wird BRAF durch das GTP gebundene (K)RAS aktiviert. Aktiviertes (K)RAS bindet mit hoher Affinität an die RAF-Kinase und es kommt zur gemeinsamen Verlagerung an die innere Zellmembran (Moodie & Wolfman, 1994). Die (B)RAF-Kinase interagiert daraufhin mit MEK (MAPK/ERK Kinase), welche somit phosphoryliert bzw. aktiviert wird (Papin et al., 1995).

Mutationen im *BRAF*-Gen führen, ebenso wie *KRAS*-Mutationen, zu einer konstitutionellen Aktivierung bzw. bei *BRAF* speziell, zu einer zehnfach gesteigerten Kinaseaktivität gegenüber dem Wildtyp-Protein (H. Davies et al., 2002). Die Mehrzahl der Kinasedomäne betreffenden *BRAF*-Mutationen befinden sich an Stelle c.1799T>A (*BRAF* V600E) des Exon 15 (Wan et al., 2004; H. Davies et al., 2002).

## **1.8 *KRAS* und *BRAF* in malignen Tumoren**

Wie bereits erwähnt, führen Mutationen im *KRAS*- und *BRAF*-Gen zu einer konstitutionellen Aktivierung der entsprechenden Proteine. Diese Proteine spielen wiederum eine Rolle im Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg. Eine Überaktivität dieses Signalweges wird in etwa 30% der humanen Krebserkrankungen gefunden (Hoshino et al., 1999). *RAS*-Mutationen lassen sich in etwa 15% bis 30% der menschlichen Tumore finden (Bos, 1989; Malumbres & Barbacid, 2003) und *BRAF*-Mutationen werden in 7% bis 15% der Karzinome nachgewiesen (H. Davies et al., 2002; Malumbres & Barbacid, 2003).

*KRAS*-Mutationen findet man in verschiedenen menschlichen Karzinomen (Bos, 1989). Dazu zählen u.a. Karzinome des Pankreas, des Endometriums, der Zervix, der Gallengänge, der Lunge und des Kolonrektums (Schubbert et al., 2007). Die Prävalenz der *KRAS*-Mutationen liegt bei Pankreaskarzinomen zwischen 69% und 95% (Concepcion Almoguera et al., 1988; Kipp et al., 2010), bei kleinzelligen Lungenkarzinomen bei 16% bis 40% (Suzuki et al., 1990; Nelson et al., 1996; S. L. Graziano et al., 1999) und Kolonkarzinome zeigen in 40% bis 45% der Fälle Mutationen (Vaughn et al., 2011; Amado et al., 2008; Karapetis et al., 2008; Baldus et al., 2010). Die hohe Frequenz der *KRAS*-Mutationen in verschiedenen Karzinomen und vor allem das frühe Auftreten in der Tumorentwicklung zeigt den hohen Stellenwert dieser Mutation (Bos et al., 1987; B Vogelstein et al., 1988).

Ebenso wie *KRAS*-Mutationen sind *BRAF*-Mutationen eine häufige Mutation in menschlichen Karzinomen. Diese sind unter anderem in Tumoren der Schilddrüse, in malignen Melanomen, in Ovarialkarzinomen (Singer et al., 2003) sowie kolorektalen Karzinomen zu finden (H. Davies et al., 2002). Papilläre Schilddrüsenkarzinome

zeigen *BRAF*-Mutationen in 45% der Fälle (Xing, 2005). Diese Karzinome sind in Verbindung mit einem positiven Mutationsstatus, assoziiert mit Fernmetastasen und fortgeschrittenem Tumorstadium (Namba et al., 2003). Eine hohe Prävalenz an *BRAF*-Mutationen wird ebenso in malignen Melanomen gefunden. *BRAF*-Mutationen erscheinen dabei in 36% bis 59% der primären Melanome und in 42% bis 66% der metastasierten Melanome (Long et al., 2011; Jakob et al., 2012; Houben et al., 2004). Das im Jahr 2011 in Europa und den USA, für Patienten mit eines inoperablen oder metastasierten Melanoms zugelassene Medikament Vemurafenib (Wirkstoff: PLX4032), ist ein selektiver Inhibitor der *BRAF*-Kinase. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten deren Tumor eine *BRAF*-Mutation (V600E) trägt, von dieser Zielgerichteten Therapie mit Voll- oder Teilremission profitieren (Flaherty et al., 2010). Dies ist ein Beispiel dafür, wie ein Gen-Mutationsstatus im Rahmen einer prätherapeutischen Testung als prädiktiver Marker für den Therapieerfolg fungieren kann.

## 1.9 *RAS (KRAS/NRAS)* und *BRAF* in kolorektalen Karzinomen

In kolorektalen Karzinomen konnte bereits gezeigt werden, dass die Prognose von Patienten bzw. das Gesamtüberleben in *KRAS* und *BRAF* mutierten Tumoren schlechter ist als in *KRAS*- und *BRAF*-Wildtypen (Richman et al., 2009). Bei Patienten mit Lungenmetastasen wurde ein gehäuftes Auftreten von *KRAS*-Mutationen nachgewiesen (Cejas et al., 2009) und Patienten mit Lebermetastasen sowie positivem *KRAS*-Mutationsstatus zeigten einen schlechteren Krankheitsverlauf als entsprechende Patienten mit Wildtypmutationsstatus (Nash et al., 2010). Auch für Mutationen im *BRAF*-Gen konnte in einer retrospektiven Studie mit 519 kolorektalen Karzinomen eine negative prognostische Vorhersagekraft gezeigt werden (Jolien Tol et al., 2009).

Die Bedeutung des *KRAS*-Gens als molekularer Prädiktor wurde in Studien deutlich, die den Therapieerfolg der monoklonalen Antikörpertherapie gegen den EGF-Rezeptor (vgl. 1.6) unter Berücksichtigung des *KRAS*-Mutationsstatus betrachteten (Amado et al., 2008; Karapetis et al., 2008). Der EGF-Rezeptor liegt in etwa 60% bis 80% der metastasierten kolorektalen Karzinome überexprimiert vor (Porebska et al.,

2000; Cunningham et al., 2004a) und geht mit einer schlechteren Prognose einher (Nicholson et al., 2001; A. Mayer et al., 1993). Die monoklonalen Antikörper Cetuximab und Panitumumab richten sich gegen diesen Rezeptor. Durch deren Bindung an den EGF-Rezeptor werden die Aktivierung und dessen nachgeschaltete Signalkaskaden gehemmt (Mendelsohn & Baselga, 2006). In Folge von Mutationen des *KRAS*-Gens kommt es, wie bereits beschrieben (vgl. 1.7), zur konstitutionellen Aktivierung des entsprechenden Proteins und damit zum Verlust der Einflussnahme durch die Hemmung des EGR-Rezeptors. Auf die Therapie dieser beiden monoklonalen Antikörper sprechen jedoch nur etwa 10% bis 23% der unselektierten Patienten mit fortgeschrittenen kolorektalen Karzinomen an (Cunningham et al., 2004b; Eric Van Cutsem et al., 2007; Meyerhardt & R. J. Mayer, 2005; Saltz et al., 2004).

Verschiedene Studien zeigten, dass die Behandlung mit Cetuximab und Panitumumab nur bei Patienten mit einem *KRAS*-Wildtypumor effektiv ist (Khambata-Ford et al., 2007; Bokemeyer et al., 2009; Eric Van Cutsem et al., 2009a; W De Roock et al., 2008; Lièvre et al., 2006; F Di Fiore et al., 2007; Amado et al., 2008; Karapetis et al., 2008). In diesen Studien wurde das Exon 2 des *KRAS*-Gens (Kodon 12 und 13) untersucht. Diese Studien fanden *KRAS*-Mutationshäufigkeiten von etwa 40%.

Da die *KRAS*-Mutationshäufigkeit in Kodon 12 und 13 nur einen Teil der Therapieversager erklären, wurden weitere Biomarker untersucht die zu einer Therapievorhersage verhelfen können. Sowohl das *KRAS*-Gen im Kodon 61 und das *BRAF*-Gen spielen eine Rolle im Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg. Auch hier konnte gezeigt werden, dass Mutationen in diesen Genen mit einem fehlenden Ansprechen auf die monoklonale Antikörpertherapie assoziiert sind (Molinari et al., 2011; Wendy De Roock, Claes, et al., 2010; F Loupakis et al., 2009; Di Nicolantonio et al., 2008). Überdies zeigten aktuelle Arbeiten aus dem Jahr 2013, dass neben *KRAS*-Mutationen auch Mutationen im *NRAS*-Gen diese Eigenschaft zeigten (Peeters et al., 2013; Douillard et al., 2013). Mutationen im *NRAS*-Gen zeigten hier in Kodon 12, 13 und 61 eine Häufigkeit von 5% (Peeters et al., 2013).

Daher wurde auf Grundlage dieser Daten von der „European Medicines Agency“ (EMA) eine Leitlinie herausgegeben die vorsieht, dass Patienten die eine *RAS*-Mutation aufweisen, von der Anti-EGFR-Therapie auszuschliessen sind (European Medicines Agency (EMA) <http://www.emea.europa.eu>). Dies widerspiegelt sich auch in der Anpassung der Zulassung von Vectibix® (Panitumumab), welche im Rote Hand-Brief vom 13.08.2013 den Nachweis des *RAS*-Wildtyp-Status (Exons 2, 3 und 4 von *KRAS* und *NRAS*) vor Therapiebeginn fordert (Fachinformation: Stand Juli 2013 Vectibix® (Panitumumab), Rote Hand-Brief vom 13.08.2013 (Amgen GmbH); <http://www.akdae.de/Arzneimittelsicherheit/RHB/Archiv/2013/20130813.pdf>).

Da das Therapieansprechen sogar bei Patienten mit *KRAS*-Wildtyp Tumoren nur bei 17% für Panitumumab-Monotherapie und 12,8% für Cetuximab-Monotherapie liegt (Amado et al., 2008; Karapetis et al., 2008) und Kombinationstherapien mit Cetuximab und den Zytostatika Irinotecan oder Oxaliplatin in 59% bzw. 61% Erfolg zeigen (Eric Van Cutsem et al., 2009a; Bokemeyer et al., 2009), ergibt sich die Frage nach weiteren Erklärungsansätzen für das Therapieversagen. Entsprechend der Datenlage und Empfehlungen erfolgt die prätherapeutische Mutationsbestimmung der *RAS*-Gene anhand von Primärtumorgewebe. Neben weiteren prädiktiven Markern wurde der Frage nach dem Mutationsstatus entsprechender Gene im Vergleich von Primärtumoren und Metastasen nachgegangen. Inwieweit sich Metastasengewebe kolorektaler Karzinome eignet, um auf den Mutationsstatus des Tumors zu schließen und ob gegebenenfalls eine zusätzliche Testung des Metastasengewebes notwendig ist, wurde in verschiedenen Studien untersucht (Gattenlohner et al., 2009; Albanese et al., 2004; Tórtola et al., 2001; Watanabe et al., 2011; Mariani et al., 2010; J. H. Park et al., 2011; Knijn et al., 2011; Baas et al., 2011; Artale et al., 2008; Baldus et al., 2010; Daniele Santini et al., 2008).

### 1.10 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, neben dem *KRAS*-Gen Kodon 12 und 13, das Kodon 61 sowie das *BRAF*-Gen (Kodon 600) einem Vergleich zwischen Primärtumormutationsstatus und Metastasenmutstionsstatus zu unterziehen. Hierbei sollten sowohl synchrone als auch metachrone Metastasen, aber auch Metastasen an unterschiedlichen Lokalisationen untersucht werden. Dabei lag ein besonderer Schwerpunkt auf den in der Literatur bislang wenig untersuchten Metastasen in regionären Lymphknoten und Metastasen im Peritoneum. Da die monoklonale Antikörpertherapie mittels Cetuximab und Panitumumab vor allem bei Patienten im fortgeschrittenen Tumorstadium und bei Patienten mit Metastasen Anwendung findet, sollte die Untersuchung des Mutationsstatus von Metastasen untereinander ebenfalls Berücksichtigung finden.

Methodisch erfolgte die Mutationsanalyse bei bereits publizierten Studien häufig mittels Sequenzierung nach Sanger. Die Methode der Pyrosequenzierung, welche sich in Studien als sensitiver gegenüber der Sequenzierung nach Sanger erwiesen hat, sollte bei dem Großteil des vorliegenden Patientenkollektivs als Methode der ersten Wahl zu Anwendung kommen.



## 2 Materialien

### 2.1 Chemikalien

Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
dNTPs	Biozym, Hess. Oldendorf
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Taq DNA Polymerase	Fermentas, Burlington, Kanada
Methylenblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
DNA Loading Dye (6x)	Fermentas, Burlington, Kanada
Gene Ruler 100bp DNA Ladder	Fermentas, Burlington, Kanada
BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing	Applied Biosystems, California, USA
Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems, California, USA
Oligonukleotide	Metabion, Martinsried
PyroMark Binding Buffer	Qiagen, Hilden
PyroMark Denaturation Solution	Qiagen, Hilden
PyroMark Wash Buffer 10x	Qiagen, Hilden
PyroMark Control Oligo	Qiagen, Hilden
PyroMark Annealing Buffer	Qiagen, Hilden
Streptavidin Sepharose™ High Performance	GE Healthcare, Upsalla, Schweden
Ethanol	Bundesmonopol, München J. T. Baker, Deventer, Holland
Polyethylenglykol PEG 8000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
EDTA	Biorad, München
TRIS	USB Corporation, Cleveland, USA
MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt

---

NaAcetat	Merck, Darmstadt
Acetat	Merck, Darmstadt

## 2.2 Kits

MagNa Pure LC DNA Isolation Kit II (Tissue)	Roche Diagnostics, Mannheim
Puregene Tissue Core Kit A	Gentra Systems, Minneapolis, USA
PyroMark Gold Q24 Reagents (5 x 24) (Enzym-Mix, Substrat-Mix, dNTPs)	Qiagen, Hilden
Taq DNA Polymerase inkl. 25mM MgCl <sub>2</sub> und 10x Reaktionspuffer (mit (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Fermentas, Burlington, Kanada

## 2.3 Geräte

Färbebehälter	
Färbeküvetten nach Hellendahl	Schubert & Weiss Omilab, München
Glaskasten mit Färbegestell und Drahtbügel	Schubert & Weiss Omilab, München
Sequencer	
ABI Prism™ 3100 Genetic Analyser	Applied Biosystems, Foster City, USA
Waagen	
R160P, L2200S	Sartorius, Göttingen
MagNa Pure LC	Roche Diagnostics, Mannheim
Pipetten	

---

Finnpipette	Thermo Labsystems
Spannungsgeräte	
Powerpac 300	Biorad, München
Speed Vac	
Savant Speed Vac Concentrator SVC 100H	Thermo Fisher, Waltham, USA
Thermoschrank	
Brutschrank Typ B 6060	Heraeus Instruments, Hanau
Reagenzglasschüttler	
Reax top	Heidolph, Schwabach
HS2 Minishaker	IKA-Labortechnik Staufen
Zentrifugen	
Varifuge 3.2RS	Heraeus Instruments, Hanau
Biofuge pico	Heraeus Instruments, Hanau
Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg,
Mikroskop/Lasermikroskop	
Stereomikroskop Typ DRC/L	Zeiss, Jena
Axiovert 200	Zeiss, Jena
Palm® Micro Beam	Zeiss, Jena
Olympus CX 31	Olympus, Hamburg
DNA Vermessung	
NanoDrop® ND-1000	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Thermocycler	
Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Geneamp PCR System 9700	Applied Biosystems, Foster City, USA
Heizblöcke	

Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Gefrier-/Kühlschränke	
Comfort, Premium	Liebherr, Biberach an der Riss
<b>2.4 Verbrauchsmaterialien</b>	
Micro Amp 8-Cup Strip	Applied Biosystems, Foster City, USA
Quali-PCR-Platten, 96-Well mit Halbrahmen, die transparent für ABI 3100	RandG.Kisker GbR Produkte für Biotechnologie, Steinfurt
3100 Genetic Analyser Plate Septa 96-Well	Applied Biosystems, Foster City, USA
Amicon® Ultra 0,5ml Centrifugal Filters	Millipore GmbH, Schwalbach
Einmalhandschuhe Latex Puderfrei	VWR, Leuven, Belgien
MembraneSlide 1,0 mm	Zeiss, Bernried
PEN-membrane covered	
24er Tube Plate, farblos	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde
Parafilm	Brand, Wertheim
PCR SingleCup 8er-SoftStrips 0,2 ml, farblos	Biozym, Hess. Oldendorf
PCR Softtubes 0,5 ml einzeln	Biozym, Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Biozym, Hess. Oldendorf
Reagenzröhrchen	Greier Bio-One, Frickenhausen
mit Schraubdeckel 15 ml, 50 ml	
Skalpelle Surgical Blade No. 11	Feather, Osaka, Japan
Safe-Lock Tubes 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
PyroMark Q24 Plates; 24-well plate	Qiagen, Hilden
Hochreines Wasser HPLC-H20	neoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg
Milli-Q 18,2	Millipore, Eschborn

## 2.5 Software

Palm® Robo Software Version 3.2	P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried
ND-1000 Version 3.3.0	NanoDrop Technologies Inc., Wilmington , USA
PyroMark Q24 Version 1.0.10	Biotage, Uppsala, Schweden
MagNA Pure LC Software Version 3.0.11	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Excel 2008 für Mac Version 12.2.6	Microsoft Corporaton, Redmond, USA
Word 2008 für Mac Version 12.2.6	Microsoft Corporaton, Redmond, USA
PASM Statistics Version 18.0.0	SPSS Inc. an IBM Company Headquarters, Chicago, USA

## 2.6 Lösungen

### 2.6.1 Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

TAE (50x)	2M Tris/Acetate/0,5M EDTA pH 8.0/Aqua dest.
Agarosegel	1,5 - 2,5 % (w/v) Agarose in 1x TAE gelöst
Ladepuff	DNA Loading Dye (6x), Thermo Scientific
Ethidiumbromidlösung	0,05 % (w/v) in H <sub>2</sub> O bidest

### 2.6.2 Peg-Mix

PEG-Mix	in 200ml H <sub>2</sub> O 52,4g EG 8000 40ml 3M NaAcetat pH 5,2 1,32ml 1M MgCl <sub>2</sub>
---------	---

## 2.7 Oligonukleotide

### 2.7.1 Primer für *KRAS/BRAF*-Mutationsanalyse am PyroMark Q24

<i>KRAS</i> PCR-und Sequenzierprimer für Kodon 12 und 13 PyroMark™ Q24 KRAS v2.0	Biotage, Uppsala, Schweden
---	-------------------------------

<i>KRAS</i> PCR-und Sequenzierprimer für Kodon 61 PyroMark™ Q24 KRAS v2.0	Biotage, Uppsala, Schweden
--	-------------------------------

<i>BRAF</i> PCR-und Sequenzierprimer für Kodon 600 PyroMark™ Q24 BRAF	Biotage, Uppsala, Schweden
--	-------------------------------

### 2.7.2 Primer für die Sequenzierung nach Sanger – *KRAS* Kodon 12 und 13

<i>Name</i>	<i>Sequenz (in 5' → 3' Richtung)</i>
<i>KRAS</i> -U2:	TAA GGC CTG CTG AAA ATG AC
<i>KRAS</i> -D:	AAA CAA GAT TTA CCT CTA TTG TTG GA

## 3 Methoden

### 3.1 DNA-Isolierung aus Patientengewebe

Zur Untersuchung des *KRAS*- und *BRAF*-Mutationsstatus wurde DNA aus Tumor- und Metastasengewebe von 109 Patienten isoliert.

#### 3.1.1 Mikrodissektion

Zur Verfügung standen in Paraffin eingebettete archivierte Gewebeproben, an denen die Routinediagnostik abgeschlossen war. Die bereits angefertigten HE-Schnitte dienten als Vorlage zur Mikrodissektion. Auf diesen war zuvor durch einen Pathologen angezeichnetes Tumor-/Metastasenareal markiert.

An einem Schlittenmikrotom wurden 2 bis 4 Paraffinschnitte einer Dicke von 4 µm angefertigt und anschließend auf Objektträger aufgezogen.

Zur Entparaffinierung wurden die Gewebeschnitte in einem Thermoschrank stehend bei 65°C für 30 Minuten inkubiert. Nachfolgend wurden die Schnitte in absteigender Xylol/Alkoholreihe in ein wässriges Milieu gebracht. Die Schnitte blieben jeweils zweimal 10 Minuten in 100%igem Xylol, zweimal 5 Minuten in 100%igem Ethanol, zweimal 5 Minuten in 96%igem Ethanol, zweimal 5 Minuten in 70%igem Ethanol und wurden anschließend in entionisiertem Wasser gespült und verblieben dort bis zur manuellen Mikrodissektion.

Um eine genaue Mikrodissektion zu gewährleisten wurden die Gewebeschnitte mit einer 0,01%igen Methylenblaulösung angefärbt. Die entparaffinierten Schnitte wurden hierzu für wenige Sekunden in der Methylenblaulösung geschwenkt und hinterher mit entionisiertem Wasser gespült.

Die Mikrodissektion der methylenblaugefärbten Schnitte erfolgte unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskopes mit 20facher Vergrößerung.

Unter Vergleichskontrolle des markierten HE-Schnittes desselben Blockes, wurde das Tumor-/Metastengewebe mithilfe eines sterilen Skalpells vom Objektträger entfernt und in ein vorbereitetes 1,5 ml Cup (mit 80 µl Lysepuffer und 20 µl Proteinase K) zur Weiterverarbeitung überführt. Die Inkubation der Proben erfolgte im Anschluss bei 57°C in einem Thermomixer über Nacht.

### 3.1.2 Lasermikrodissektion

Die bei dieser Arbeit zur Anwendung gekommene Methode der Laser-Mikrodissektion war die sogenannte „Laser Microdissection and Pressure Catapulting“ (LMPC). Bei dieser Form der Lasermikrodissektion wird das mittels UV-Laser ausgeschnittene Material entgegen der Schwerkraft in ein Auffanggefäß katapultiert. Das verwendete Mikroskop Axiovert 200 Zeiss, Jena war ausgestattet mit den Laserkomponenten Palm® Micro Beam von Zeiss, Jena.

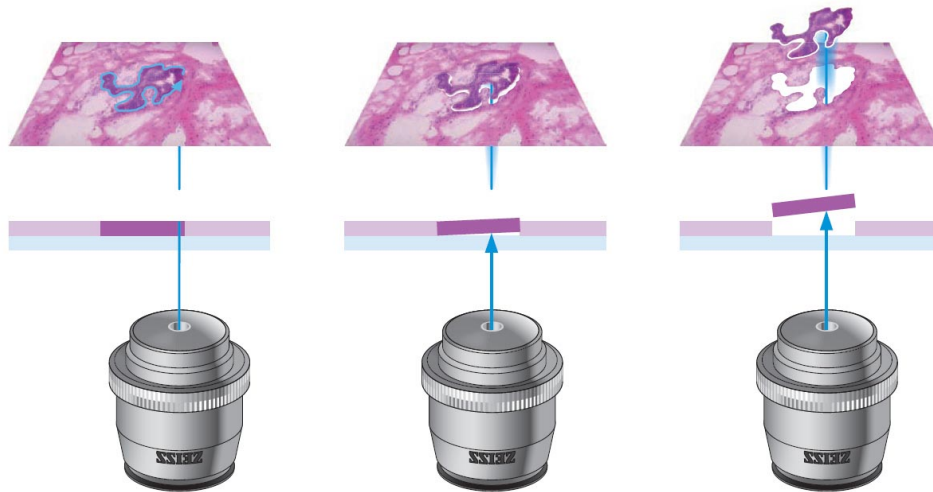
Für die Lasermikrodissektion wurden, wie bei der manuellen Mikrodissektion (vgl. 3.1.1), 4 Paraffinschnitte einer Dicke von 4 µm angefertigt und anschließend auf spezielle Objektträger aufgezogen. Die verwendeten Objektträger (MembraneSlide 1,0 mm PEN-membrane covered; Zeiss, Bernried) sind mit einer aus thermoplastischen Polyethylenaphthalat Membran überzogen, welche vor Gebrauch mit UV-Licht (254 nm) für 10 Minuten bestrahlt wurden. Die angefertigten und auf die vorbehandelten Objektträger aufgezogenen Schnitte wurden anschließend bei 37°C über Nacht getrocknet.

Am nächsten Tag erfolgte die Entparaffinierung und die Färbung mit Methylenblau. Hierzu wurden die Gewebeschnitte in einem Thermoschrank stehend bei 65°C für 30 Minuten inkubiert. Nachfolgend wurden die Schnitte in absteigender Xylol/Alkoholreihe in ein wässriges Milieu gebracht. Die Schnitte blieben jeweils zweimal 10 Minuten in 100%igem Xylol, zweimal 5 Minuten in 100%igem Ethanol, zweimal 5 Minuten in 96%igem Ethanol, zweimal 5 Minuten in 70%igem Ethanol und wurden anschließend in entionisiertem Wasser gespült.

Zur Färbung wurden die Objektträger wenige Sekunden in Methylenblaulösung geschwenkt, überschüssige Lösung wurde anschließend mit entionisiertem Wasser abgespült und es erfolgte eine wiederholte Trocknung bei 37°C über Nacht. Zur Vermeidung von Blasenbildung oder Wassereinschlüssen zwischen Membran und Glasobjektträger wurde die Membran vor der Trocknung, mittels sterilem Skalpell, an einigen Stellen eingerissen.



Bei der darauf folgenden Lasermikrodissektion wurden die zu untersuchenden Tumoreareale am Mikroskop aufgesucht, auf einem externen Monitor mittels Softwareunterstützung (Palm® Robo Software Version 3.2; P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried) virtuell markiert und mittels Laser herausgeschnitten. Die ausgeschnittenen Gewebeareale wurden dann durch einen Laserimpuls gegen die Schwerkraft in einen Deckel eines 0,2 ml PCR Gefäßes katapultiert, in dem sich bereits eine ProteinaseK-Lösung für den weiteren Verdau befand (Abb. 2). Im Weiteren erfolgte die DNA-Isolierung mittels Puregene Tissue Core Kit A von Hand (vgl. 3.1.4).



**Abbildung 2: Lasermikrodissektion mittels Palm® Micro Beam von Zeiss, Copyright Carl Zeiss Microscopy GmbH** (Quelle: [http://www.cf.gu.se/digitalAssets/1176/1176633\\_LMD\\_cuttingprocess.jpg](http://www.cf.gu.se/digitalAssets/1176/1176633_LMD_cuttingprocess.jpg)). Das zuvor virtuell markierte Gewebeareal wird mittels Laser herausgeschnitten und anschließend durch einen Laserimpuls, gegen die Schwerkraft, in ein Gefäß katapultiert.

### 3.1.3 DNA-Isolierung mittels MagNa Pure LC

Die nach der Mikrodissektion erfolgte DNA-Isolierung wurde mit dem Gerät MagNa Pure LC von Roche nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurde das MagNa Pure LC DNA-Isolation Kit II (Tissue) verwendet.

### 3.1.4 DNA-Isolierung mittels Puregene Tissue Core Kit A

Die DNA-Isolierung mittels Puregene Tissue Core Kit A von Gendra Systems, Minneapolis, USA kam nach der Lasermikrodissektion zum Einsatz.

Das nach der Lasermikrodissektion gewonnene Gewebematerial wurde in ein vorbereitetes 1,5 ml Cup (mit 300 µl Lysepuffer und 1,5 µl Proteinase K (20 mg/ml)) pipettiert und über Nacht bei 55°C in einem Thermomixer inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Aufreinigung von Hand. Nach Abkühlung der Probe auf Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 100 µl Protein Precipitation Solution zum Zelllysate. Nach 20 Sekunden Vortexen wurde das Lysat bei 16.000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde zur Weiterverarbeitung in ein 1,5 ml Cup überführt, das 300 µl, 100%iges Isopropanol enthielt. Es wurden 0,5 µl Glykogen Solution (20 mg/ml) hinzugefügt und das Gemisch wurde 50 mal geschwenkt. Es folgte die zweite Zentrifugation bei 16.000 rpm für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und darauf 300 µl, 70%iges Ethanol zum Pellet hinzugefügt. Nach dem Schwenken erfolgte die dritte Zentrifugation bei 16.000 rpm für eine Minute. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei offenem Cup für 5 Minuten getrocknet. Nach Zugabe von 20 µl Hydration Solution und Inkubation für 1 Stunde bei 65°C im Thermomixer wurde die gereinigte DNA bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert.

### 3.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch mithilfe des Nanodrop® ND-1000 von Peggab bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die theoretische Grundlage der Vermessung von Nukleinsäuren beruht dabei auf dem Labert Beersch'schen Gesetz:

$$c = (A \cdot \epsilon) / d$$

wobei c der Konzentration, A der Absorption,  $\epsilon$  dem Extinktionskoeffizienten und d der Schichtdicke entspricht. Die Reinheit der DNA wird aus dem Quotienten der Extinktion bei 260 nm und 280 nm ermittelt, wobei bei einem Wert von 1,8 von reiner DNA ausgegangen wird. Zur Konzentrationsbestimmung wurden 1,6 µl der isolierten DNA eingesetzt.

### 3.2.1 DNA Aufkonzentrierung

Die für die Mutationsanalyse notwendige PCR benötigte üblicherweise eine DNA-Gesamtmenge von 20-50 ng. Dies machte es bei DNA-Proben mit einer Konzentration unter 10 ng/µl notwendig die DNA aufzukonzentrieren.

Zur Aufkonzentrierung wurden Amicon® Ultra 0,5 ml Centrifugal Filters verwendet. Hierzu wurde die gesamte Probe in den Filter mit dem dazugehörigen Cup pipettiert. Nach 4 Minuten bei 8000 rpm Zentrifugation wurde der Filter umgedreht in ein neues Cups gesetzt und erneut für 3 Minuten und 4000 rpm zentrifugiert, wobei das Cup mit dem Filtrat verworfen wurde. Das in dem neuen Cup befindliche DNA-Konzentrat wurde wiederholt einer DNA-Messung unterzogen.

### 3.3 Mutationsanalyse des Exons 2 (Kodon 12 und 13) des *KRAS*-Gens mittels ABI Prism™ 3100 Genetic Analyser

#### 3.3.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Um das gewünschte DNA-Fragment spezifisch zu vervielfältigen bzw. zu amplifizieren, wurde die Polymerase Kettenreaktion (PCR) angewendet. Hierbei handelt es sich um eine Reaktion, die auf drei immer wiederkehrenden Zyklen beruht:

1. Denaturierung: Die DNA-Moleküle der Lösung werden auf 94°C erhitzt, wobei sich die komplementären DNA-Stränge voneinander trennen
2. Primerhybridisierung (Annealing): Das Absenken der Temperatur auf 55°C führt zur Anlagerung der Primer an spezifische DNA-Abschnitte
3. Elongation: Bei einer Temperatur von 72°C verlängert die Polymerase, durch den Einbau komplementärer Nukleotide an der freien 3'-OH-Stelle, die DNA

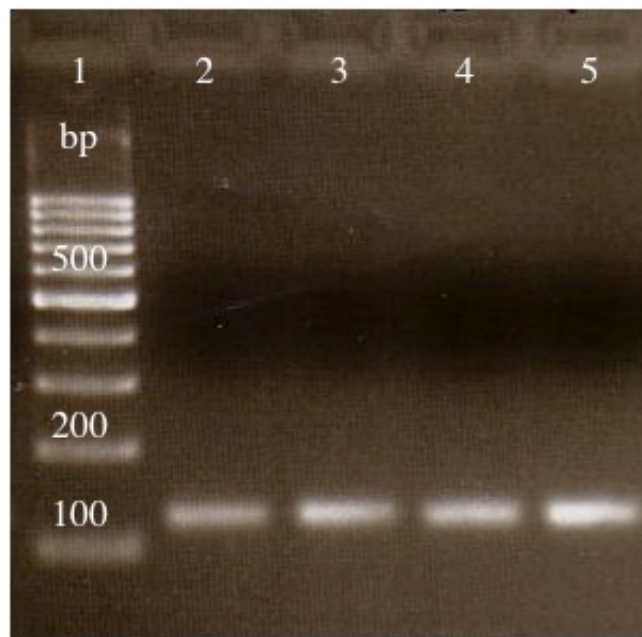
Die bei dieser Reaktion verwendete Polymerase ist die sogenannte Taq-Polymerase. Diese aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* stammende Polymerase zeichnet sich

durch hohe Hitzestabilität aus und übersteht dadurch die hohen Temperaturen im Schritt der Denaturierung. Durch die Verlängerung der Primer am komplementären DNA-Strang entstehen neue DNA-Stränge. Unter optimalen Bedingungen kommt es bei jedem Zyklus zu einer Verdopplung der gewünschten DNA-Sequenz. Somit kann aus DNA weniger Zellen eine hohe Menge an zu untersuchendem genetischen Materials gewonnen werden.

Das Reaktionsvolumen der in dieser Arbeit verwendeten PCR setzte sich zusammen aus 20 µl Mastermix und 10 µl template DNA. Der 20 µl Mastermix enthielt H<sub>2</sub>O, 5% DMSO, 1,5 µM MgCl<sub>2</sub>, 10x Taq-Polymerase-Puffer, 0,2 mM dNTPs, 0,3 µM Primermix (*KRAS*-U2 & -D) sowie 0,02 U/µl Taq Polymerase. Abhängig von der DNA-Konzentration, die idealerweise 20-50 ng betrug, konnten 1-10 µl template DNA eingesetzt werden (bei Konzentrationen zwischen 5-200 ng/µl), die durch H<sub>2</sub>O Zugabe konstant auf 30 µl Gesamtvolumen gehalten wurden. Es erfolgten 35 Amplifikationszyklen mit den Phasen: Denaturierung (1 min bei 94°C), Primerhybridisierung (1 min bei 55°C) und Elongation (1 min bei 72°C).

### 3.3.2 Gelelektrophorese von DNA

Die Gelelektrophorese kam zur Überprüfung der PCR-Produkte zum Einsatz (Abb. 3). Diese Methode zur Trennung von Molekülen bedient sich einer Matrix aus Agarosepolymeren an der ein elektrisches Feld anliegt, welches die insgesamt negativ geladenen DNA-Moleküle nach ihrer Größe nach auftrennt. Die Poren dieser Matrix erlauben es kleineren Molekülen schneller und größeren langsamer entlang des elektrischen Feldes zu wandern. Das in dieser Arbeit zu erwartende PCR-Produkt hatte eine Länge von 139 bp. Mittels Agarose und TAE wurde ein 2,5%iges Agarosegel hergestellt. In 0,5 ml Reaktionsgefäße wurden 3 µl Xylencyanol und 5 µl PCR-Produkt gegeben, gemischt und kurz abzentrifugiert. Zwei µl 100 bp DNA-Längenstandard wurden in den ersten Slot, die PCR-Produkte in die darauf folgenden Slots pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 110 V für 30 Minuten durchgeführt. Zur Sichtbarmachung der DNA kam das Gel anschließend in eine Ethidiumbromidlösung für 20 Minuten und wurde dann mittels UV-Licht sichtbar gemacht sowie EDV gestützt fotodokumentiert.



**Abbildung 3: Agarose-Gelelektrophorese.** Im ersten Slot befindet sich der DNA-Längenstandard (pb). Die PCR-Produkte befinden in die darauf folgenden Slots mit einer Länge von 139 bp (repräsentativer Ausschnitt).

### 3.3.3 PEG-Fällung

Um das PCR-Produkt von überschüssigen Primern und Nucleotiden zu reinigen wurde die PEG (Polyethylenglykol) Fällung eingesetzt. PEG-Mix und PCR-Produkt wurden im Mischungsverhältnis 1:1 in ein 1,5 ml Cup gegeben und einige Sekunden gevortext. Nach 20 Minuten Inkubation wurden die Proben 25 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend sofort abgezogen, 100  $\mu$ l EtOH (100%) zugegeben und nach zweimaligem Schwenken erfolgte die zweite Zentrifugation für 15 Minuten bei 13000 rpm. Der Überstand wurde sorgfältig abgezogen und das Pellet 2 Minuten im Speed-Vac getrocknet. Durch Zugabe von 12  $\mu$ l H<sub>2</sub>O wurde das Pellet in Lösung gebracht und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert.

### 3.3.4 Konzentrationsbestimmung

Die Qualität und Menge der gereinigten PCR-Produkte wurde mithilfe eines 2,5%igen Agarosegels überprüft. Die eingesetzte DNA-Menge betrug 2  $\mu$ l in 1  $\mu$ l Xylenxanol und 3  $\mu$ l H<sub>2</sub>O (Vorgehen siehe 3.3.2).

### 3.3.5 Sequenzierung mittels Didesoxymethode nach Sanger

Die hier zum Einsatz gekommene Methode der Bestimmung der DNA-Sequenz geht auf Frederick Sanger zurück. An einem bekannten DNA-Abschnitt bindet ein komplementärer Primer, an dessen 3'-OH-Ende eine passende Hydroxygruppe als Startpunkt für die DNA-Polymerase Platz findet und anknüpfend die Replikation mittels Desoxyribonukleosid-Triphosphaten (dNTPs) vollzieht. Des Weiteren befinden sich in diesem Ansatz Nukleotide, die als Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) vorliegen. Die 3'-OH Gruppe fehlt bei diesen Basen, sodass eine DNA-Verlängerung bei dem Einbau dieser Substrate nicht weiter möglich ist und es zum sogenannten Kettenabbruch kommt. Durch den zufälligen Einbau dieser zusätzlich fluoreszenzmarkierten ddNTPs entstehen im Rahmen der Sequenzierreaktion unterschiedlich lange DNA-Stränge. Die endständige und für die vier verschiedenen ddNTPs codierenden Fluoreszenzmarkierungen sowie die DNA-Stranglänge ermöglicht es dem Sequenzer, mittels Kapillarelektrophorese und mithilfe eines Lasers, die Abfolge der Basen zu bestimmen und anhand eines Chromatogramms darzustellen (Abb. 4).

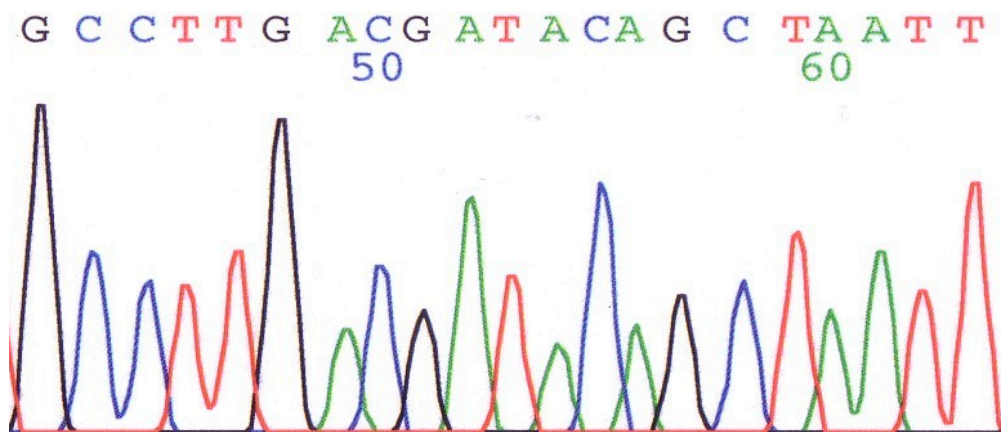


Abbildung 4: Chromatogramm einer Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurde der Sequenzer ABI Prism™ 3100 Genetic Analyser von Applied Biosystems, Foster City, USA verwendet. Bei der Sequenzierreaktion wurden die Proben mit jeweils einem Mix aus Sequenzierprimern *KRAS-U2* und *KRAS-D* (je 3,2 µM) versetzt. Die in die Sequenzierreaktion eingesetzte PCR-

Produkt Menge wurde anhand der Konzentration des gereinigten PCR-Produktes festgelegt. Für die Sequenzierreaktion wurden standardmäßig 2 µl Premix (BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing), 3 µl 5x Sequenzierpuffer, 2 µl Sequenzierprimer (3,2 µM) und 1-5 µl PCR-Produkt zusammen pipettiert und mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt.

Das gewählte Sequenzierprogramm setzte sich zusammen aus 25 Zyklen mit den Phasen: Denaturierung (96°C für 15 Sekunden), Primerhybridisierung (50°C für 15 Sekunden) und Elongation (60°C für 4 Minuten).

Nach der Sequenzierreaktion wurde der Ansatz einer Ethanolfällung unterzogen bei dem 20 µl des Sequenzieransatzes in 1,5 ml Cups mit 80 µl H<sub>2</sub>O, 10 µl NaAc und 250 µl EtOH (100%) pipettiert wurden. Nach dem Vortexen und 10 Minuten im Dunkeln stehen lassen, wurden die Proben bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 250 µl EthOH (70%) zugegeben. Nach der zweiten Zentrifugation für 10 Minuten bei 13000 rpm musste der Überstand vorsichtig abgezogen werden und das verbliebene Pellet wurde 2 Minuten im Speed-Vac getrocknet.

Bei der Vorbereitung für den Sequenzer wurden 15 µl Formamid zu dem getrockneten Pellet gegeben, kurz inkubiert, zentrifugiert und in eine ABI Reactionplate pipettiert, die anschließend in den ABI Prism™ 3100 Genetic Analyser zur Sequenzierung gegeben wurde.

### **3.4 Mutationsanalyse des Exons 2 (Kodon 12 und 13) und Exon 3 (Kodon 61) des *KRAS*-Gens und des Exon 15 (Kodon 600) des *BRAF*-Gens mittels PyroMark**

Bei der Mutationsanalyse des *KRAS*-Gens Kodon 12, 13, 61 und des *BRAF*-Gens mittels Pyrosequenzierung wurde jeweils in ähnlicher Weise vorgegangen.

### 3.4.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR) für Mutationsanalyse mittels Pyrosequenzierung

Um das gewünschte DNA-Fragment spezifisch zu amplifizieren und diese der Sequenzierung mittels PyroMark zuzuführen, wurde die Polymerase Kettenreaktion (PCR) angewendet. Für Kodon 12 und 13, Kodon 61 des *KRAS*-Gens und Kodon 600 des *BRAF*-Gens wurde jeweils ein separater Reaktionsansatz verwendet. Das Reaktionsvolumen setzte sich zusammen aus 30 µl Mastermix und 5 µl template DNA. Der 20 µl Mastermix enthielt H<sub>2</sub>O, 5% DMSO, 1,5 µM MgCl<sub>2</sub>, 10x Taq-Polymerase-Puffer, 0,2 mM dNTPs, 0,3 µM Primermix (*KRAS* for & rev bzw. *BRAF* for & rev) sowie 0,02 U/µl Taq Polymerase. Abhängig von der DNA-Konzentration konnten 1-5 µl template DNA eingesetzt werden (ca. 20-50 ng DNA), die durch H<sub>2</sub>O Zugabe konstant auf 35 µl Gesamtvolumen gehalten wurden. Es erfolgten 45 Amplifikationszyklen mit den Phasen: Denaturierung (30 sec bei 94°C), Primerhybridisierung (30 sec bei 53°C) und Elongation (30 sec bei 72°C).

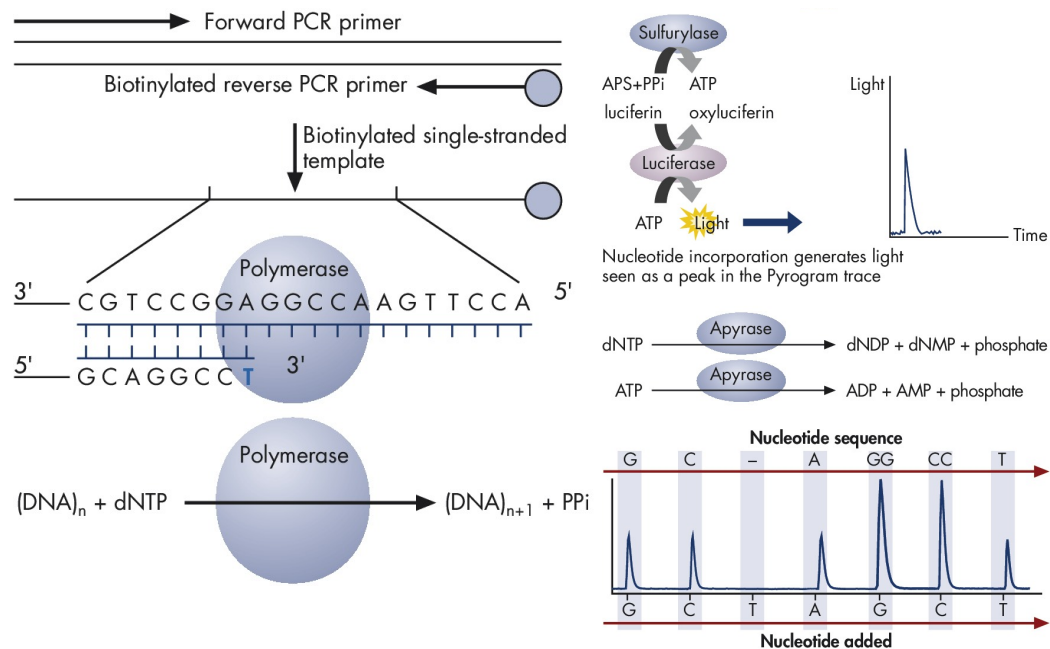
Um den Erfolg und die Qualität der PCR zu überprüfen wurde im Anschluss eine Gelelektrophorese der DNA durchgeführt.

### 3.4.2 Prinzip der Pyrosequenzierung

Das Prinzip der Pyrosequenzierung nutzt, wie in der bereits erwähnten Sanger-Sequenzierung, eine DNA-Polymerase zur Synthese eines komplementären DNA-Stranges. Die Sequenzierung erfolgt schrittweise für jedes zu sequenzierende Nukleotid. Im ersten Schritt erfolgt die Bindung eines Sequenzierprimers an die einzelsträngige template DNA. Nach Inkubation mit DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luziferase, Apyrase sowie Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS) und Luziferin, wird eins der Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) dem Ansatz automatisch hinzugefügt. Die DNA-Polymerase baut nun das dNTP an den Primer, wenn es dem komplementären DNA-Strang entspricht, ein. Kommt es zum Einbau wird Pyrophosphat (PPi) in äquimolarer Menge zur Anzahl der eingebauten Nukleotide frei. Das Pyrophosphat sowie das Adenosin-5'-Phosphosulfat werden mit Hilfe der ATP-Sulfurylase in Adenosintriphosphat (ATP) umgewandelt. Dieses



ATP wird von der Luziferase benötigt um das Luziferin in Oxiluziferin umzuwandeln, bei dessen Prozess Licht in proportionaler Menge zum ATP entsteht. Mittels CCD-Kamera wird dieses Licht quantifiziert und anhand eines Pyrogramms graphisch dargestellt. Die Apyrase degradiert permanent ATP und nicht eingebaute dNTPs, so dass ein neuer Schritt mit der Zugabe eines anderen dNTPs erfolgen kann. Da die Reihenfolge der Nukleotidzugabe vorgegeben ist, kann über die erhaltenen Peaks die Sequenz des DNA-Komplementärstranges abgelesen werden (Abb. 5). Im Pyrogramm ist auf der y-Achse die Lichtintensität und auf der x-Achse sind die zugegebenen Nukleotide aufgetragen.



**Abbildung 5: Prinzip der Pyrosequenzierung (Ronaghi et al., 1998),** (Quelle der Abb.: [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com), Copyright Qiagen GmbH). Das erste von vier Nukleotiden bindet, mittels DNA-Polymerase, an die zu analysierende DNA-Sequenz und es entsteht Pyrophosphat (PPi). Jedes PPi ist äquimolar zur Anzahl der eingebauten Nukleotide. Eine ATP-Sulfurylase setzt unter Adenosin-5'-Phosphosulfat quantitativ in ATP um. Unter ATP-Verbrauch wird in einer Luciferase-Reaktion Luciferin in Oxyluciferin umgewandelt und sichtbares Licht, einer Stärke die proportional zur ATP-Menge ist, wird erzeugt. Das Licht wird mittels CCD-Kamera detektiert und anhand eines Pyrogramms dargestellt. Eine Apyrase degradiert nicht eingebaute Nukleotide und ATP ab und es erfolgt im nächsten Schritt der Einbau des zweiten von vier Nukleotiden. Im Pyrogramm ist auf der y-Achse die Lichtintensität und auf

der x-Achse sind die zugegebenen Nukleotide aufgetragen. Durch die einzelne Zugabe der Nukleotide kann im Pyrogramm die Nukleotidsequenz des DNA-Komplementärstranges abgelesen werden.

### 3.4.3 Vorbereitung für den PyroMark Q24

Die Pyrosequenzierung erfolgte in dieser Arbeit mittels PyroMark Q24. Die biotinylierten PCR-Produkte wurden, wie folgt, für den PyroMark Q24 aufbereitet: Um die PCR-Produkte an die Beads zu immobilisieren wurden Streptavidin-beschichtete Sepharose-Beads (3 µl je Probe) mit Binding-Buffer (40 µl je Probe) in ein 2,0 ml Tube gemischt. Um ein Gesamtvolumen von 80 µl pro Einsatz zu erhalten wurde bei 20 µl PCR-Produkt mit 17 µl H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die vorbereitete Lösung wurde auf eine 24er Tube Plate verteilt, mit dem PCR-Produkt zusammenpipettiert und mit Strip-Kappen verschlossen. Darauf folgte das Schütteln des Ansatzes für 5 Minuten bei 14000 rpm im Reagenzglasschüttler. Sequenzierprimer (1,05 µl je Probe bei 0,3 µM) und Anealing-Buffer (33,95 µl je Probe) wurden auf eine PyroMark Q24 Plate verteilt.

Immobilisiertes PCR-Produkt wurde dann aus der 24er Tube Plate mittels der Vacuum Prep Workstation angesaugt, in 70%igem Ethanol (für 5 Sekunden) gewaschen, denaturiert in der Denaturation Solution (für 5 Sekunden) und im Wash-Buffer gewaschen (für 10 Sekunden). Nun vorbereitetes immobilisiertes PCR-Produkt wurde dann auf die PyroMark Q24 Plate mit Sequenzierprimer und Anealing-Buffer überführt und 2 Minuten bei 80°C auf einem Heizblock erwärmt. Nach 5 Minuten Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die PyroMark Q24 Plate mit den Proben in den PyroMark Q24 zur Sequenzierung gegeben.

## 4 Ergebnisse

Analysiert wurden in dieser Arbeit insgesamt 284 DNA-Proben von Tumoren und Metastasen kolorektaler Karzinome von 109 Patienten. Die DNA wurde aus paraffineingebetteten archivierten Gewebeproben gewonnen (vgl. 3.1.1). Es wurden 52 Proben mittels Sangersequenzierung untersucht. Die weiteren 232 Proben konnten mit Hilfe des PyroMark Q24 sequenziert werden. Die Tumoren und Metastasen wurden primär auf den *KRAS*-Mutationsstatus in Kodon 12 und 13 untersucht. Die Proben, welche im ersten Durchlauf einen *KRAS*-Wildtyp zeigten, wurden im Weiteren auf den *KRAS*-Mutationsstatus im Kodon 61 untersucht. Gewebeproben die im Kodon 12, 13 und 61 des *KRAS*-Gens einen Wildtyp aufwiesen, wurden anschließend auf den Mutationsstatus des *BRAF*-Gens Kodon 600 untersucht. Von den 109 Patienten konnte jeweils der Primärtumor und mindestens eine Metastase auf den *KRAS*- und *BRAF*-Mutationsstatus analysiert werden. Ziel dieser Arbeit war es, einen Vergleich von Primärtumor und Metastase im Bezug auf den *KRAS*- und *BRAF*-Mutationsstatus zu ziehen. Eine Übereinstimmung des *KRAS*- und *BRAF*-Mutationsstatus wurde definiert als das Vorhandensein bzw. Fehlen der untersuchten Mutation sowohl im Tumor als auch in den zugehörigen Metastasen.

### 4.1 Patientengut

In dieser Arbeit wurden Tumoren und Metastasen kolorektaler Karzinome von 109 Patienten untersucht. Die Metastasen waren histologisch gesicherte Metastasen primärer kolorektaler Karzinome. Die Verteilung der klinisch-pathologischen Parameter der Arbeit werden im Folgenden aufgezeigt.

#### 4.1.1 Tumorstadium

Es konnten in dieser Arbeit Tumoren aller vier Tumorstadien von pT1 bis pT4 berücksichtigt werden. Demnach befanden sich 51,4% der Tumore im Stadium pT3, gefolgt von 38,5% Tumoren im Stadium pT4 und 10,1% verteilten sich auf die Stadien pT1 und pT2. Die absolute Verteilung der Tumoren auf die Tumorstadien zeigt nachfolgende Tabelle.

Tumorstadium					
		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	pT1	2	1,8	1,8	1,8
	pT2	9	8,3	8,3	10,1
	pT3	56	51,4	51,4	61,5
	pT4	42	38,5	38,5	100,0
	Gesamt	109	100,0	100,0	

**Tabelle 2: Verteilung des Tumorstadiums (pT1-pT4).** Mit 51,4% befanden sich die meisten Tumoren im Stadium pT3 gefolgt von 38,5% im Stadium pT4. Es wurden Tumoren metastasierter kolorektaler Karzinome aller vier Tumorstadien untersucht.

#### 4.1.2 Nodalstatus

Der routinemäßig erfasste Nodalstatus, der im Rahmen einer radikalen Tumoresektion mindestens 12 (empfohlen zwischen 20 und 30) Lymphknoten berücksichtigt, zeigte in unserem Patientenkollektiv ein ausgeglichenes Verteilungsmuster (vgl. Tab. 3). 34,9% der Fälle befanden sich im Status N2, 33,0% befanden sich im Status N0 und 30,3% der Fälle zeigten den Status N1. Im Status Nx, als nicht beurteilbarer Lymphknotenstatus, befanden sich 1,8% der untersuchten Fälle.

N-Status					
		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	N0	36	33,0	33,0	33,0
	N1	33	30,3	30,3	63,3
	N2	38	34,9	34,9	98,2
	Nx	2	1,8	1,8	100,0
	Gesamt	109	100,0	100,0	

**Tabelle 3: Verteilung des N-Status.** Der Lymphknotenstatus zeigte ein ausgeglichenes Verteilungsmuster auf die Stadien: N0, N1 und N2. In 1,8% der Fälle war der Lymphknotenstatus nicht beurteilbar.

### 4.1.3 Fernmetastasen

Schwerpunkt dieser Arbeit war es, den *KRAS*- und *BRAF*-Mutationsstatus von kolorektalen Primärtumoren im Vergleich zum *KRAS*- und *BRAF*-Mutationsstatus zugehöriger Regionär- oder Fernmetastasen zu beurteilen. Im Rahmen der präexperimentellen Recherche galt es demnach Tumoren im positiven M-Status zu untersuchen. Nach diesem Kriterium fanden somit 55,9% der Tumoren mit positivem M-Status Eingang in das Patientenkollektiv (vgl. Tab. 4). Da unser Interesse nicht nur Metastasen galt, die synchron zum Tumor auftraten, sondern auch metachron (beispielsweise nach mehreren Monaten), sind in 43,4% der Fälle Tumoren im Status M0 oder Mx untersucht worden. Die zugehörigen Metastasen fanden zum Zeitpunkt der Erhebung der TNM-Klassifikation noch keine Berücksichtigung. Durch diese retrospektive Vorgehensweise konnte letztlich zu jedem Tumor mindestens eine Regionär- oder Fernmetastase untersucht werden.

M-Status					
		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	keine Fernmetastasen (M0)	4	3,7	3,7	3,7
	Fernmetastasen (M1)	48	44,0	44,0	47,7
	Fernmetastasen in einem Organ (M1a)	13	11,9	11,9	59,6
	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden (Mx)	44	40,4	40,4	100,0
	Gesamt	109	100,0	100,0	

**Tabelle 4: Verteilung des M-Status.** Der zum Zeitpunkt der Erstdiagnose erhobene M-Status zeigt in 55,9% der Fälle Fernmetastasen an. In 40,4% der Fälle konnte der Pathologe keinen M-Status erheben. In 3,7% der Fälle lag bei der Erstdiagnose keine Metastase vor.

#### 4.1.4 Lokalisation der Primärtumoren

Die Primärtumore unseres Patientenkollektivs verteilten sich auf alle Kolonabschnitte. Der Großteil der Tumoren befanden sich mit 39,4% im Rektum, gefolgt von Tumoren im Colon sigmoideum mit 19,3% und jeweils 10,1% im Colon ascendens und Colon descendens. Die restlichen Tumoren befanden sich im Appendix, Coecum, rechter und linker Colonflexur, Colon transversum und rektosigmoidalem Übergang.

Lokalisation (Primärtumoren)					
		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	Appendix	2	1,8	1,8	1,8
	Coecum	9	8,3	8,3	10,1
	Colon ascendens	11	10,1	10,1	20,2
	re. Colonflexur	3	2,8	2,8	57,8
	Colon transversum	5	4,6	4,6	54,1
	li. Colonflexur	1	,9	,9	55,0
	Colon descendens	11	10,1	10,1	30,3
	Colon sigmoideum	21	19,3	19,3	49,5
	Rektosigmoid	3	2,8	2,8	60,6
	Rektum	43	39,4	39,4	100,0
	Gesamt	109	100,0	100,0	

**Tabelle 5: Verteilung der Primärtumoren.** Es konnten Tumore aus allen Kolonabschnitten untersucht werden. Die meisten Tumore befanden sich mit 39,4% im Rektum, 19,3% im Colon sigmoideum und jeweils 10,1% im Colon ascendens und Colon descendens.

#### 4.1.5 Differenzierungsgrad

Der Differenzierungsgrad (Grading) wird im Rahmen der Primärtumordiagnostik erhoben und gibt an, inwieweit das Tumorgewebe in seiner mikroskopischen Morphologie vom normalen Gewebe abweicht. Die Mehrheit der von uns untersuchten Tumoren befanden sich im Differenzierungsgrad G2 mit 52,3% sowie im Differenzierungsgrad G3 mit 40,4%. In 1,8% der Fälle lag der Differenzierungsgrad G1 vor und in 5,5% der Fälle war keine Klassifikation vorhanden.

Differenzierungsgrad					
		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	G1	2	1,8	1,8	1,8
	G2	57	52,3	52,3	54,1
	G3	44	40,4	40,4	94,5
	GX	6	5,5	5,5	100,0
	Gesamt	109	100,0	100,0	

**Tabelle 6: Verteilung des Differenzierungsgrades (Grading).** Im Differenzierungsgrad G2 befanden sich 52,3% der Tumore, gefolgt von 40,2% im Differenzierungsgrad G3.

#### 4.1.6 Altersverteilung

Das Patientenalter unseres Kollektivs lag zum Zeitpunkt der Erstdiagnose im Mittel bei 63 Jahren und umfasste eine Altersspanne von 57 Jahren. Der jüngste Tumorpatient hatte ein Alter von 33 Jahren und der älteste ein Alter von 90 Jahren.

Altersverteilung							
	N	Spann- weite	Mini- mum	Maxi- mum	Mittel- wert	Standard- abweichung	Varianz
Alter	109	57	33	90	63,42	12,331	152,06
Gültige Werte (Listenweise)	109						

**Tabelle 7: Alter zum Zeitpunkt der Diagnose.** Das Altersmittel zum Zeitpunkt der Erstdiagnose lag bei 63,42 Jahren, wobei der jüngste Patient 33 Jahre und der älteste 90 Jahre alt war.

#### 4.1.7 Zustand nach Radiochemotherapie

Neben der Erfassung der klinisch-pathologischen Parameter wurde in unserer Arbeit auch der Status des Zustands nach Radiochemotherapie betrachtet. In 92 Fällen (84,4%) befanden sich die Tumore zum Zeitpunkt der pathologischen Befundung nicht im Zustand nach Radiochemotherapie. In 14 Fällen (12,8%) wiesen Tumoren diesen Status auf. Hierbei handelte es sich im überwiegenden Teil (12 Fälle), um Tumoren mit der Lokalisation im Rektum. Die beiden übrigen Fälle waren im Colon sigmoideum und Colon descendens lokalisiert.

Z.n. Radiochemotherapie				
	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig ja	14	12,8	12,8	12,8
nein	92	84,4	84,4	97,2
nicht bekannt	3	2,8	2,8	100,0
Gesamt	109	100,0	100,0	

**Tabelle 8: Z.n. Radiochemotherapie.** 12,8% der Tumoren befandens sich im Z.n. Radiochemotherapie.

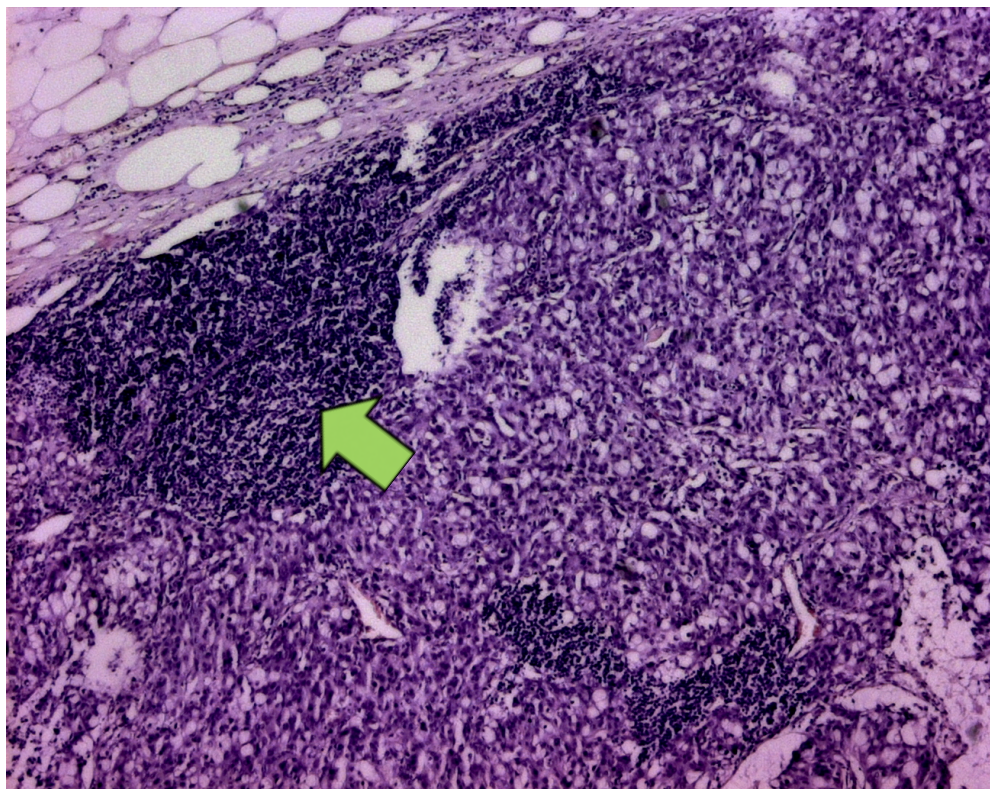
#### 4.1.8 Metastasenverteilung

Insgesamt wurden für diese Arbeit 170 Metastasen kolorektaler Karzinome auf den *KRAS*- und *BRAF*-Mutationsstatus untersucht. Dieser erhobene Mutationsstatus wurde im Weiteren dann mit dem Status, zugehöriger Primärtumoren, verglichen. Die Ausbreitung kolorektaler Karzinome erfolgt sowohl per continuitatem als auch lymphogen und hämatogen (vgl. 1.4). Unter Berücksichtigung dieser verschiedenen Metastasierungswege wurden Metastasen unterschiedlicher Lokalisation gewählt. Es konnten 55 Lebermetastasen, 51 Lymphknotenmetastasen, 34 Metastasen im Peritoneum sowie 15 Lungenmetastasen untersucht werden. Des Weiteren wurden Metastasen im Ovar, Hirn, Harnblase, Ureter, Haut und Knochen auf Ihren Mutationsstatus überprüft. Zu den bereits oben erwähnten 170 Proben Metastasengewebes addieren sich 5 Proben synchroner bzw. metachroner Zweittumore hinzu, sodass man auf Summe von 175 untersuchter Vergleichsproben kommt.



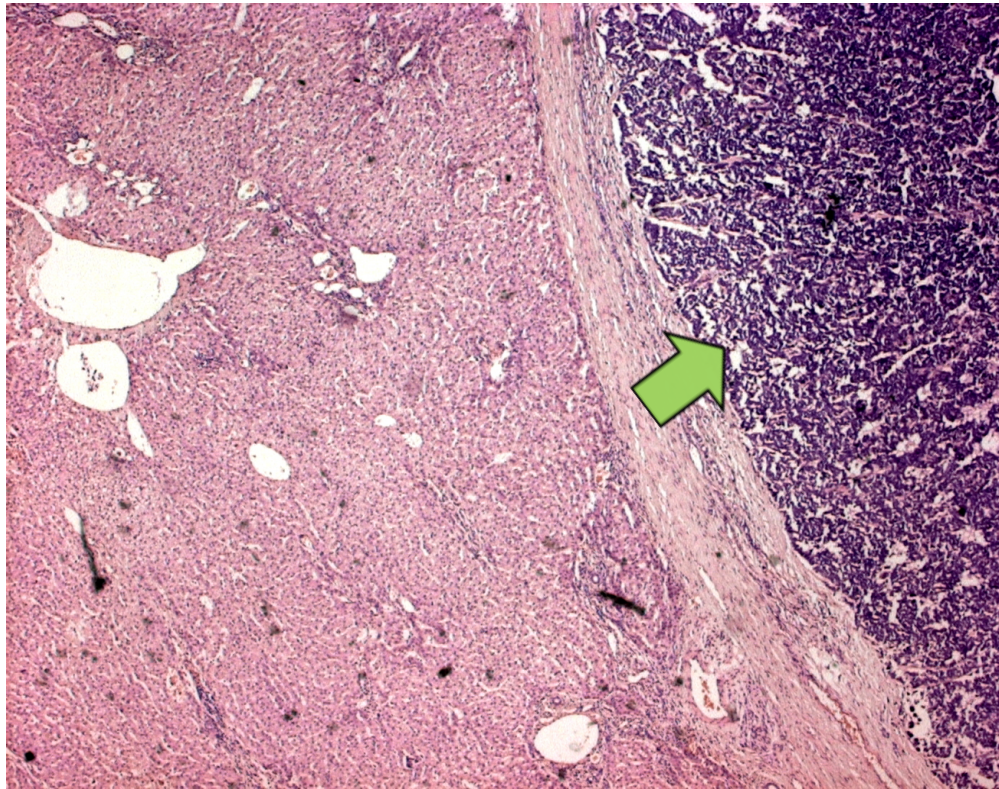
		Metastasen			
		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	Leber	55	32,4	32,4	32,4
	Lymphknoten	51	30,0	30,0	62,4
	Peritoneum	34	20,0	20,0	82,4
	Lunge	15	8,8	8,8	91,2
	Ovar	5	2,9	2,9	94,1
	Hirn	4	2,4	2,4	96,5
	Harnblase	2	1,2	1,2	97,6
	Ureter	2	1,2	1,2	98,8
	Haut	1	,6	,6	99,4
	Knochen	1	,6	,6	100,0
	Gesamt	170	100,0	100,0	

**Tabelle 9: Verteilung der Metastasen.** Insgesamt wurden 170 Metastasen kolorektaler Karzinome auf den *KRAS/BRAF*-Mutationsstatus untersucht. Hierbei handelte es sich um 55 Lebermetastasen, 51 Lymphknoten, 34 Metastasen im Peritoneum und 15 Lungenmetastasen. Des Weiteren wurden Metastasen im Ovar, Hirn, Harnblase, Ureter, Haut und Knochen analysiert werden.

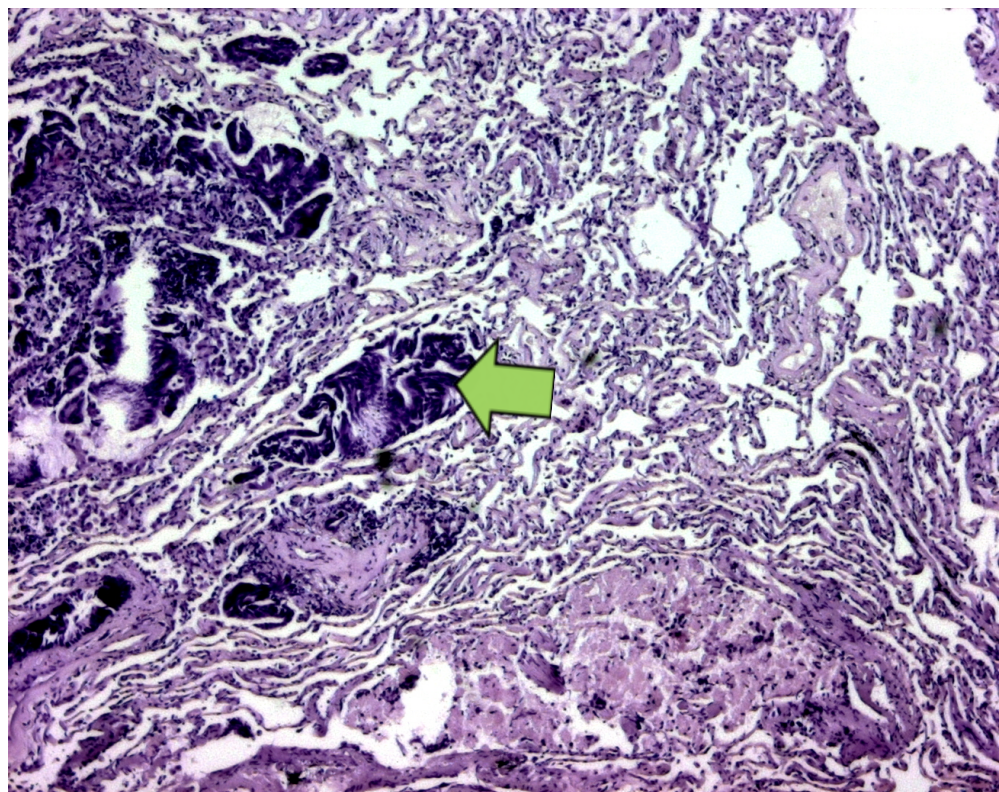


**Abbildung 6: Lymphknotenmetastase (grüner Pfeil), HE-Präparat**



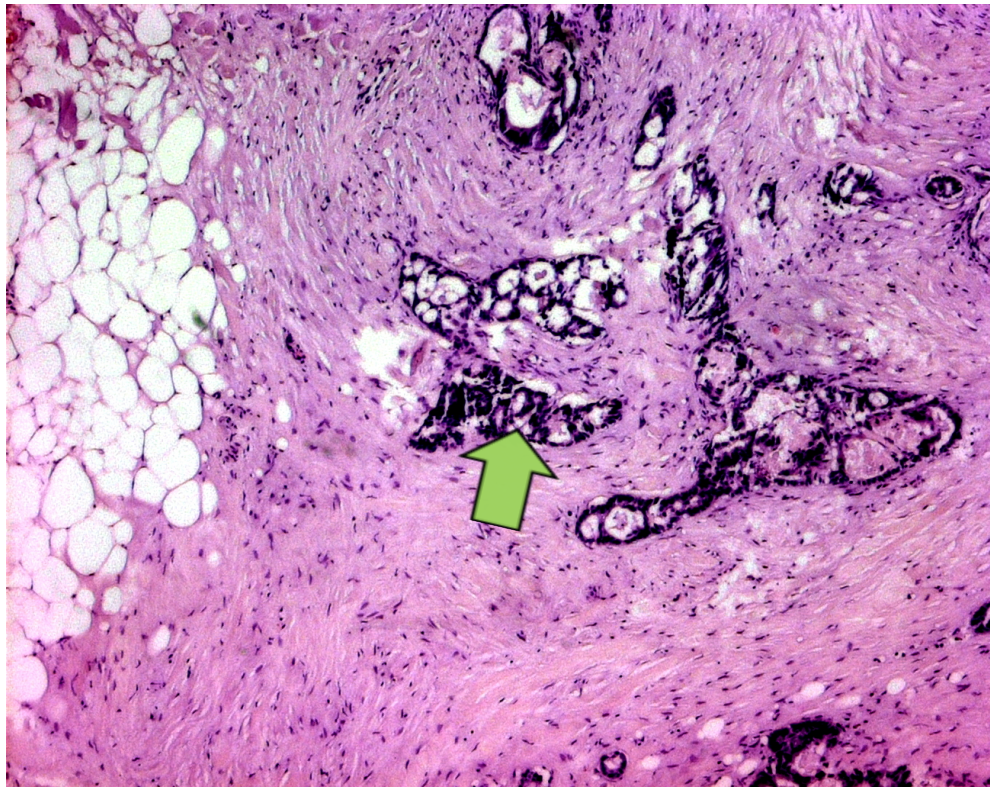


**Abbildung 7: Lebermetastase (grüner Pfeil), HE-Präparat**



**Abbildung 8: Lungenmetastase (grüner Pfeil), HE-Präparat**





**Abbildung 9: Peritonealkarzinose (grüner Pfeil), HE-Präparat**

#### **4.1.9 Synchrone und metachrone Metastasen/Zweittumoren**

Neben der Analyse und Berücksichtigung unterschiedlich lokalisierter Metastasen und Tumore sollte auch das zeitliche Auftreten der Metastasen als Parameter einbezogen werden.

Nachfolgende Tabelle (vgl. Tab. 10) zeigt die Verteilung der Metastasen im Bezug auf das zeitliche Auftreten zum Primärtumor. Die Metastasen bzw. Tumore die als synchron bezeichnet wurden, finden sich in der folgenden Tabelle unter der Spalte: Zeit (in Monaten) 0. Die Anzahl der synchronen Proben lag bei  $n = 99$  und die Anzahl der metachronen Proben bei  $n = 76$ .

Bei drei Patienten konnte darüber hinaus ein zusätzlicher metachroner Zweittumor und bei einem weiteren Patienten zwei metachrone Tumoren untersucht werden. Außerdem konnten in 55 Fällen mehr als zwei Metastasen untersucht werden.

Zeit bis zur Diagnose Metastase/Zweittumor (in Monaten)							
Zeit (in Monaten)		0	0-6	6-12	12-24	24-36	>36
Häufigkeit (absolut)	Zweittumor	-	-	1	2	2	-
	Lymphknoten	50	-	-	-	1	-
	Leber	26	15	5	3	2	4
	Peritoneum	21	1	4	1	6	1
	Lunge	-	2	3	3	4	3
	Ovar	1	2	-	1	1	-
	Hirn	1	-	-	1	-	2
	Harnblase	-	-	-	-	-	2
	Ureter	-	-	-	-	-	2
	Knochen	-	-	-	1	-	-
	Haut	-	1	-	-	-	-

**Tabelle 10: Zeit bis zur Diagnose Metastase/Zweittumor.** Es konnte der *KRAS/BRAF*-Mutationsstatus verschiedenster zeitlicher Abstände zwischen Primärtumor und histologisch gesicherter Metastase/Zweittumor erhoben werden. Davon waren den Primärtumore 99 Proben synchron und 76 Proben metachron zugeordnet.

## 4.2 *KRAS* und *BRAF* Mutationsanalyse

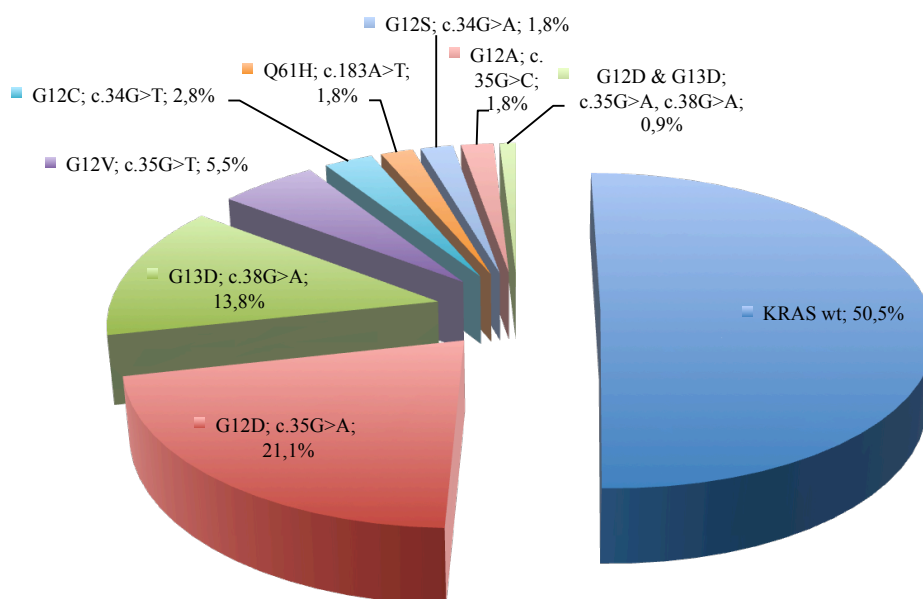
### 4.2.1 Häufigkeit der *KRAS*-Mutation in Primärtumoren

Die mittels Sanger- und Pyrosequenzierung untersuchten 109 Primärtumoren zeigten im *KRAS*-Gen für Kodon 12 und Kodon 13 eine Mutationshäufigkeit von 47,7%. Zusammen mit dem Kodon 61 zeigt sich eine Mutationshäufigkeit von 49,5%. Der *KRAS*-Wildtyp wurde in 55 Tumoren (50,5%) diagnostiziert. Das Verhältnis der Mutationen des Exons 2 lag bei 70,6% in Kodon 12 und 29,4% in Kodon 13. Die beiden häufigsten Punktmutation im *KRAS*-Gen befanden sich im Kodon 12 an Stelle c.35G>A; G12D sowie im Kodon 13 an Stelle c.38G>A; G13D. In einem Primärtumor wurde eine Doppelmutation an Stelle c.35G>A & c.38G>A; G12D & G13D diagnostiziert. Das Kodon 61 lag an Stelle c.183A>T; Q61H in 1,8% mutiert vor. Folgende Tabelle (Tab. 11) und das Diagramm (Abb. 10) zeigen die Verteilung und Häufigkeit der gefundenen *KRAS*-Mutationen:

Mutationshäufigkeit des *KRAS*-Gens in Kodon 12,13 und 61

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig Wildtyp	55	50,5	50,5	50,5
G12D; c.35G>A	23	21,1	21,1	71,6
G13D; c.38G>A	15	13,8	13,8	85,3
G12V; c.35G>T	6	5,5	5,5	90,8
G12C; c.34G>T	3	2,8	2,8	93,6
Q61H; c.183A>T	2	1,8	1,8	95,4
G12S; c.34G>A	2	1,8	1,8	97,2
G12A; c.35G>C	2	1,8	1,8	99,1
G12D & G13D; c.35G>A & c.38G>A	1	0,9	0,9	100,0
Gesamt	109	100,0	100,0	

**Tabelle 11: Verteilung der *KRAS*-Mutationen in Primärtumoren.** Das *KRAS*-Gen lag für Kodon 12, 13 und 61 in 49,5% der Fälle mutiert vor. Die häufigste Mutation befand sich an Stelle G12D; c.35G>A. In einem Tumor wurde eine Doppelmutation diagnostiziert (G12D & G13D; c.35G>A & c.38G>A).



**Abbildung 10: Verteilung der *KRAS*-Mutationen in Primärtumoren (Kreisdiagramm).** Daten siehe Tabelle 11.

Die Mutationsanalyse konnte im Laufe dieser Arbeit von der Sangersequenzierung auf die Pyrosequenzierung umgestellt werden. Zur Beurteilung der Sensitivität der beiden verschiedenen Methoden wurde die Mutationsfrequenz der Primärtumoren beider Methoden miteinander verglichen.

Von den 109 Patienten wurden 17 Primärtumoren nach der Sangersequenzierung untersucht und dabei 8 Mutationen im *KRAS*-Gen Kodon 12 und 13 diagnostiziert. Dieses Ergebnis entspricht einer Mutationsfrequenz von 47,1%. Gegenüberstehend konnten mittels Pyrosequenzierung bei 92 Primärtumoren 44 Mutationen im *KRAS*-Gen Kodon 12 und 13 festgestellt werden, welches einer Mutationsfrequenz von 47,8% entspricht.

#### 4.2.2 Häufigkeit der *KRAS/BRAF*-Mutation in Primärtumoren

Die Tumoren die im *KRAS*-Gen einen Wildtyp aufwiesen (sowohl Kodon 12, 13, als auch Kodon 61) wurden darüber hinaus auf den *BRAF*-Mutationsstatus hin untersucht. Das *BRAF*-Gen lag in 7 Tumoren (6,4%) mutiert vor. Insgesamt zeigte sich damit eine Mutationshäufigkeit (*KRAS* und *BRAF*) von 56%. Folgende Tabelle zeigt die Mutationsverteilung für *KRAS* und *BRAF* in den untersuchten Tumoren:

**Mutationshäufigkeit des *KRAS/BRAF*-Gens**

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig Wildtyp	48	44,0	44,0	44,0
G12D; c.35G>A	23	21,1	21,1	65,1
G13D; c.38G>A	15	13,8	13,8	78,9
V600E; c.1799T>A	7	6,4	6,4	85,3
G12V; c.35G>T	6	5,5	5,5	90,8
G12C; c.34G>T	3	2,8	2,8	93,6
Q61H; c.183A>T	2	1,8	1,8	95,4
G12S; c.34G>A	2	1,8	1,8	97,2
G12A; c.35G>C	2	1,8	1,8	99,1
G12D & G13D; c.35G>A & c.38G>A	1	,9	,9	100,0
Gesamt	109	100,0	100,0	

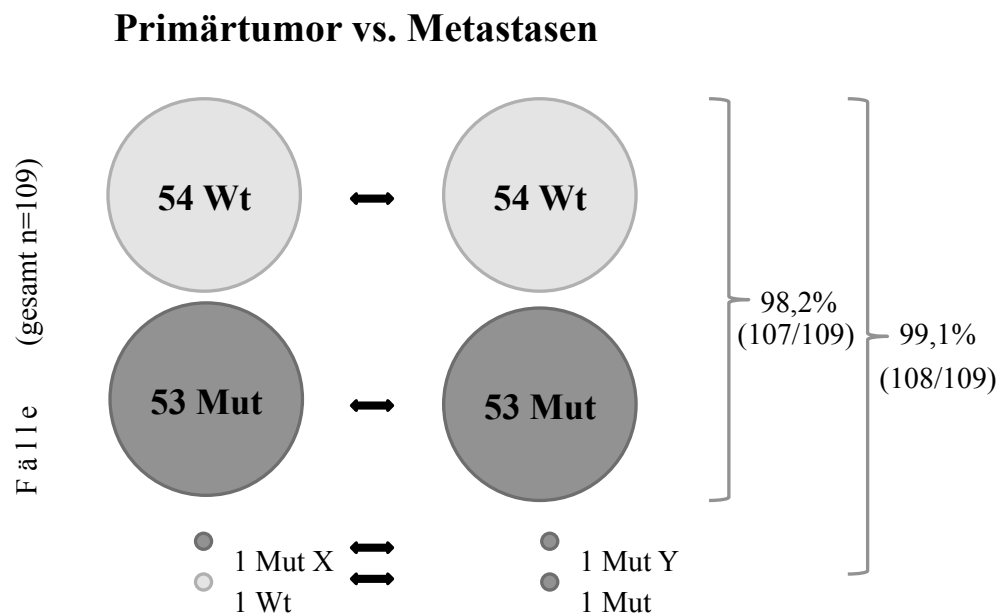
**Tabelle 12: Verteilung der *KRAS/BRAF*-Mutationen in Primärtumoren.** Das *BRAF*-Gen war in 6,4% der *KRAS*-Wildtyp Tumore mutiert. *KRAS* und *BRAF* zeigten gemeinsam eine Mutationshäufigkeit von 56%.

### 4.2.3 Vergleich der *KRAS*- und *BRAF*-Mutation zwischen Primärtumoren und Metastasen

Der Vergleich des *KRAS*- und *BRAF*-Mutationsstatus zwischen Primärtumoren und den korrespondierenden Proben zeigte in 107 von 109 Fällen eine vollständige Übereinstimmung. Diese Übereinstimmung gilt sowohl für den Vergleich zwischen Primärtumoren und Metastasen, als auch zwischen Metastasen eines Falles untereinander.

In 54 von 109 (49,5%) Fällen lagen bei diesem Vergleich der Primärtumor und die zugehörigen Metastasen im *KRAS*-Gen als Wildtyp vor. Bei 53 von 109 (48,6%) Patienten diagnostizierten wir entweder für das *KRAS*-Gen Kodon 12, 13, 61 oder das *BRAF*-Gen Kodon 600 eine Mutation, die sich sowohl im Tumor als auch den entsprechenden Metastasen zeigte.

In zwei der 109 Fälle wurde eine Diskrepanz im *KRAS*-Mutationsstatus (Kodon 12) diagnostiziert. Unter Berücksichtigung dieser beiden Fälle, lag die Übereinstimmungsquote bei 98,2% (107/109). Unter klinischen Gesichtspunkten erhält man eine Übereinstimmung die bei 99,1% (108/109) liegt (vgl. Abb. 11).



**Abbildung 11: Übersicht der Anzahl übereinstimmender und diskrepanter Fälle, unter Berücksichtigung des *KRAS*- und *BRAF*- Mutationsstatus. Abkürzungen: Wt, Wildtyp; Mut, Mutation (*KRAS* oder *BRAF*)**

Um die Signifikanz dieses Vergleichs zu untermauern wurde eine statistische Auswertung mithilfe des Statistikprogramms SPSS durchgeführt. Hierzu wurde der für verbundene Stichproben anzuwendende McNemar-Test durchgeführt. Unter Beachtung der zwei diskrepanten Fälle gibt der McNemar-Test bei 109 Fällen einen p-Wert von 1,0 an. Der p-Wert gibt an, wie stark die gestellte Nullhypothese unseres Ergebnisses anzunehmen ist. Ein kleiner p-Wert spricht gegen und ein p-Wert von 1,0 für diese Annahme dieser Hypothese. Unsere Nullhypothese, dass es einen Zusammenhang zwischen Tumormutationsstatus und Metastasenmutationsstatus gibt, wird mit dem erhaltenen Ergebnis von  $p = 1,0$  angenommen.

Chi-Quadrat-Tests		
	Wert	Exakte Signifikanz (2-seitig)
McNemar-Test		1,000 <sup>a</sup>
Anzahl der gültigen Fälle	109	

a. Verwendete Binomialverteilung

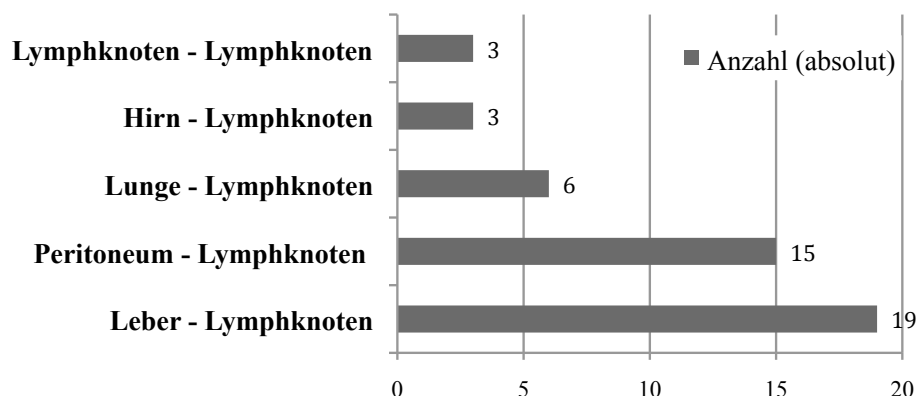
**Tabelle 13: McNemar-Test: Mutationsstatus (Tumor versus Metastase).** Der McNemar-Test für verbundene Stichproben zeigt einen p-Wert von 1 an. Die Nullhypothese, dass ein Zusammenhang des Mutationsstatus zwischen Tumor und Metastasen besteht, wird somit angenommen.

#### 4.2.4 Vergleich des *KRAS*- und *BRAF*-Mutationsstatus von Metastasen untereinander

In Fällen bei denen mehr als eine Metastase untersucht werden konnte ( $n=50$ ), zeigt sich bei dem Vergleich der Metastasen untereinander, sowohl für synchrone ( $n=19$ ) als auch metachrone Proben ( $n=31$ ), eine vollständige (100%) Übereinstimmung des *KRAS*- und *BRAF*-Mutationsstatus. In 40 Fällen konnten zwei Metastasen, in 9 Fällen drei Metastasen und in einem Fall vier Metastasen je Fall miteinander verglichen werden.

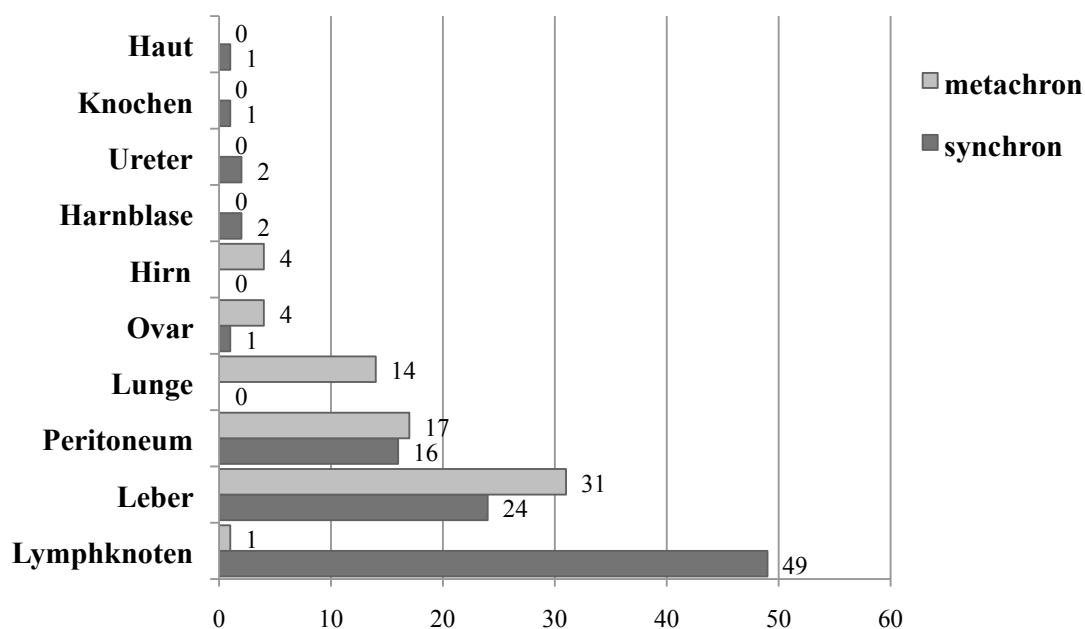
Kombinationen aus Lymphknotenmetastase und einer weiteren Metastase waren ein häufiger Befund ( $n=46$ ). In 19 Fällen war das Vergleichspaar Lymphknotenmetastase und Lebermetastase die häufigste Formation (vgl. Tab.14).





**Tabelle 14: Anzahl verschieden lokalisierter und korrespondierender Metastasen (Vergleichspaare), die im Mutationsstatus übereinstimmen (absolute Häufigkeit).**

Die Tabelle 15 gibt einen Überblick über die absolute Anzahl der übereinstimmenden Metastasen mit dem korrespondierenden Primärtumor. Des Weiteren zeigen die in der Tabelle 16 dargestellten Ergebnisse eine Übersicht des Vergleiches zwischen Tumor und mindestens zwei Metastasen.



**Tabelle 15: Übersicht der übereinstimmenden Metastasen mit Primärtumor (absolute Häufigkeit).** Das Balkendiagramm zeigt die Verteilung der synchronen und metachronen Metastasen die im *KRAS*- und *BRAF*-Mutationsstatus mit dem Status der korrespondierenden Primärtumoren übereinstimmen.

ID	Lokalisation	Tumor 1	Zeit bis Tumor 2	Tumor 3	Lymphk. MTX-1	Lymphk. MTX-2	Leber MTX-1	Leber MTX-2	Lungen MTX	Periton eum MTX-1	Periton eum MTX-2	Ovar MTX-1	Ovar MTX-2	Hirn MTX	Ureter MTX-1	Ureter MTX-2
1	Rektum	wt					9,3 wt	108,1 wt	80,8 wt							
7	Rektum	wt			0,0 wt		14,9 wt									
12	Rektum	wt			0,0 wt											
14	Rektum	wt			0,0 wt		0,0 wt							127,8 wt		
15	Rektum	wt			0,0 wt									-6,1 wt		
17	Rektum	wt										0,0 wt	0,3 wt			
30	Sigma	wt			0,0 wt		-0,8 wt									
32	Rektum	wt					19,4 wt	54,6 wt								
42	Ascendens	wt			0,0 wt					0,0 wt						
55	Rektum	wt			0,0 wt											
65	Sigma	wt					9,8 wt			72,9 wt			12,1 wt			
85	Sigma	wt			0,0 wt		22,8 wt									
88	Il. Colonflexur	wt			0,0 wt					0,0 wt						
95	Ascendens	wt			0,0 wt					0,0 wt						
97	Sigma	wt			0,0 wt				44,1 wt							
100	Caecum	wt								88,9 wt	88,9 wt					
102	Descendens	wt			0,0 wt					0,0 wt						
103	Rektum	wt			0,0 wt		13,2 wt									
112	Sigma	wt			0,0 wt		0,0 wt									
113	Rektum	wt			0,0 wt											
115	nd.	wt					38,6 wt		38,6 wt							
101	Ascendens	wt			0,0 c.36G>T					0,0 c.36G>T						
76	Ascendens	c.1799T>A			0,0 c.1799T>A					6,3 c.1799T>A						
86	Descendens	c.1799T>A			0,0 c.1799T>A					0,0 c.1799T>A						
111	re. Colonflexur	c.1799T>A								0,0 c.1799T>A	0,0 c.1799T>A					
5	Caecum	c.38G>A			0,0 c.38G>A		115,8 c.38G>A	10,8 c.38G>A								
29	Descendens	c.38G>A			0,0 c.38G>A											
53	Rektum	c.38G>A	61,4 c.38G>A		0,0 c.38G>A											
67	Ascendens	c.38G>A			0,0 c.38G>A											
75	Rektum	c.38G>A			0,0 c.38G>A					79,8 c.38G>A	92,2 c.38G>A					
90	Caecum	c.38G>A			0,0 c.38G>A		31,6 c.38G>A		72,7 c.38G>A							
93	Sigma	c.38G>A			0,0 c.38G>A					29,3 c.38G>A	29,3 c.38G>A					
114	Sigma	c.38G>A			0,0 c.38G>A					0,0 c.38G>A						
24	Rektum	c.35G>T			0,0 c.35G>T		0,0 c.35G>T									
31	Caecum	c.35G>T			0,0 c.35G>T		28,9 c.35G>T									
66	Rektum	c.35G>T	46,6 c.35G>T	75,7 c.35G>T	0,0 c.35G>A											
56	Rektum	c.35G>T			0,0 c.35G>A				2,7 c.35G>A							
77	Rektum	c.35G>T			0,0 c.35G>A											
58	Rektum	c.35G>A			0,0 c.35G>A					41,8 c.35G>A						
59	Rektum	c.35G>A			0,0 c.35G>A					80,4 c.35G>A						
62	Sigma	c.35G>A	27,8 c.35G>A		0,0 c.35G>A	60,4 c.35G>A	4,4 c.35G>A			27,8 c.35G>A						
73	Rektum	c.35G>A			0,0 c.35G>A		0,0 c.35G>A			0,0 c.35G>A						
104	re. Colonflexur	c.35G>A			0,0 c.35G>A	0,0 c.35G>A	0,0 c.35G>A									
108	Sigma	c.35G>A			0,0 c.35G>A					0,0 c.35G>A						
117	Descendens	c.35G>A			0,0 c.35G>A											
25	Transversum	c.35G>A			0,0 c.35G>A											
92	Descendens	c.35G>A			0,0 c.35G>A											
48	Descendens	c.34G>T			0,0 c.34G>T											
78	Rektum	c.34G>T			0,0 c.34G>T				22,8 c.34G>T							
6	Ascendens	c.34G>A			0,0 c.34G>A		0,1 c.34G>A									
9	Rektum	c.34G>A			0,0 c.34G>A		15,2 c.34G>A									
110	Ascendens	c.34G>A			0,0 c.34G>A											
41	Rektum	c.183A>T			0,0 c.183A>T		1,2 c.183A>T	7,3 c.183A>T								
99	Caecum	c.183A>T			0,0 c.183A>T	0,0 c.183A>T				0,0 c.183A>T						

**Tabelle 16: Übersicht der Tumoren mit mindestens zwei Vergleichspaaren.** Die Tabelle zeigt die Gegenüberstellung des *KRAS/BRAF*-Mutationsstatus von mindestens zwei Vergleichspaaren (Tumor vs. Tumor; Tumor vs. Metastasen; Tumor vs. Tumor vs. Metastase).

#### 4.2.5 Diskrepante Fälle

Der Vergleich von Primärtumor und Metastasen in Bezug auf den *KRAS*- und *BRAF*-Mutationsstatus zeigte in 2 von 109 Fällen (1,8%) Diskrepanzen. Von den beiden abweichenden Fällen war einer (0,9%) von klinischer Bedeutung.

Die zwei abweichenden Fälle wurden aufgrund folgender Merkmale als diskrepant eingestuft:

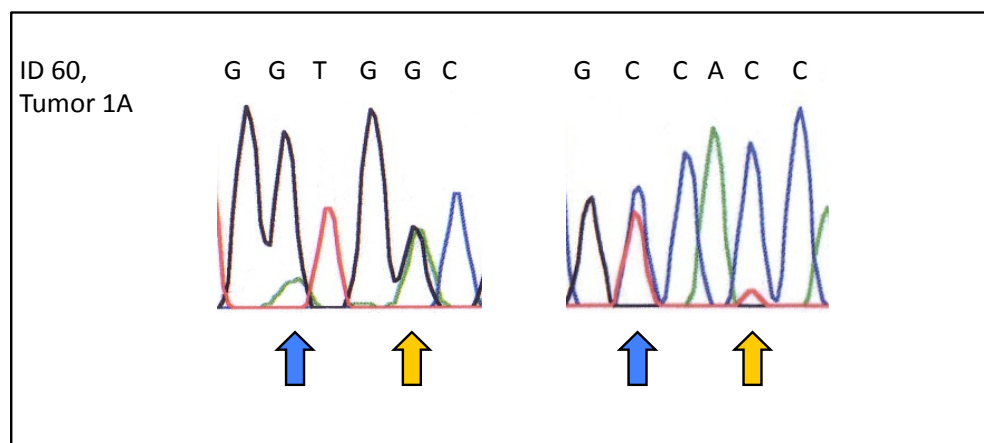
Der *erste* Fall (ID 60) zeigte im Primärtumor eine Doppelmutation (*KRAS* Kodon 12/13), die dazugehörige Metastase war jedoch einfach mutiert.

Der *zweite* Fall (ID 101) zeigte im Primärtumor einen Wildtyp, sowohl für das *KRAS*-, als auch *BRAF*-Gen, jedoch lagen die Metastasen in mutierter Form (*KRAS* Kodon 12) vor.

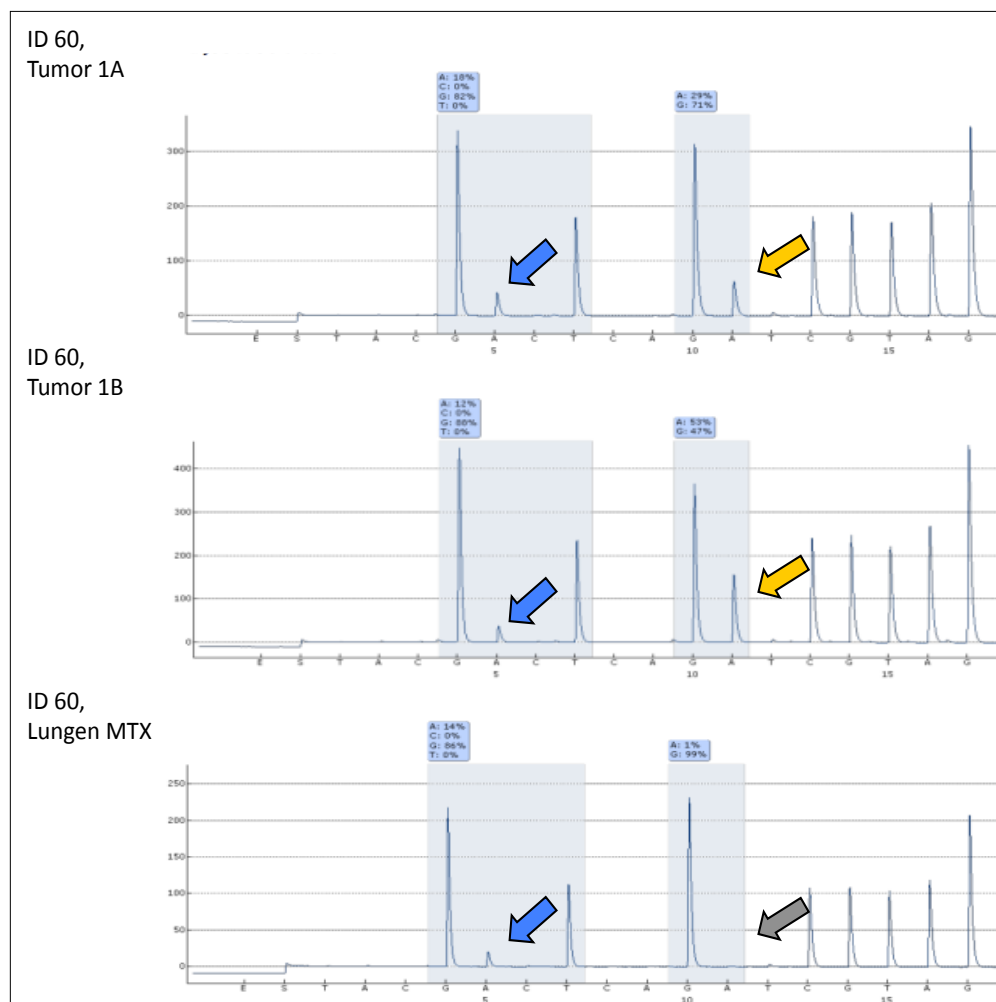
Als klinisch relevant wurde der Fall mit der ID 101 eingestuft, da es hier abhängig von der Gewebeprobe zu unterschiedlichen Therapieentscheidungen (vgl. 1.9) gekommen wäre.

Zu den diskrepanten Fällen:

Bei dem Patienten mit der ID 60 war der Primärtumor im Coecum lokalisiert. Die Tumorklassifikation wurde mit pT3N1Mx festgelegt und der Tumor befand sich im Differenzierungsgrad G2. Bei der Mutationsanalyse im Bezug auf den *KRAS*- und *BRAF*-Status diagnostizierten wir in zwei verschiedenen Tumorabschnitten (Probe 1A/Probe 1B) eine Doppelmutation an Stelle c.35G>A & c.38G>A; G12D & G13D. Die Verifizierung der Diagnose erfolgte durch wiederholte Pyrosequenzierung und zusätzlicher Sangersequenzierung (Abb. 12 & 13). Die metachrone Lungenmetastase (Zeitraum der Tumordiagnose bis zur Metastasendiagnose: 19,9 Monate) war im *KRAS*-Gen an Stelle c.35G>A; G12D einfach mutiert.

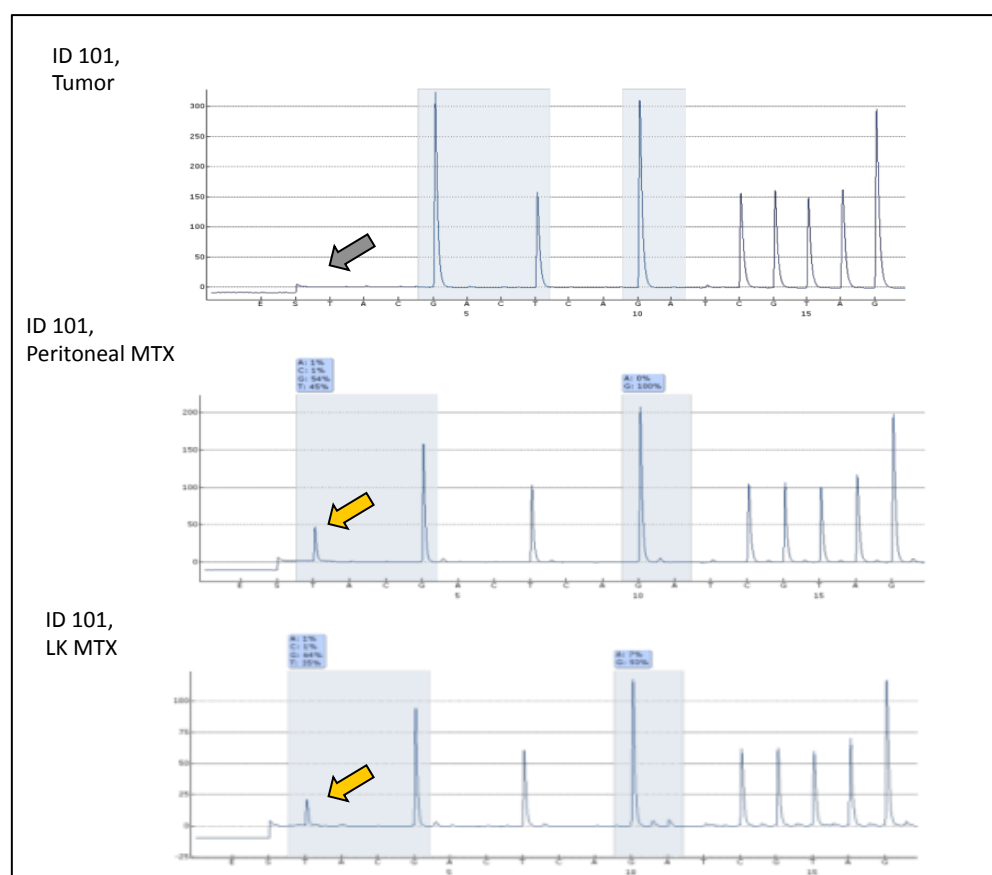


**Abbildung 12: Chromatogramm Tumor ID 60.** Die Abbildung zeigt das Chromatogramm des Tumors mit der Doppelmutation an Stelle c.35G>A & c.38G>A; G12D & G13D für den DNA Upstream und Downstream.



**Abbildung 13: Pyrogramm Tumor und Metastase ID 60.** Das Pyrogramm weist für zwei verschiedenen Tumorabschnitte (ID 60 Tumor 1A und 1B) eine Doppelmutation nach. Die zugehörige Lungenmetastase zeigt eine einfache Punktmutation an Stelle c.35G>A; G12D.

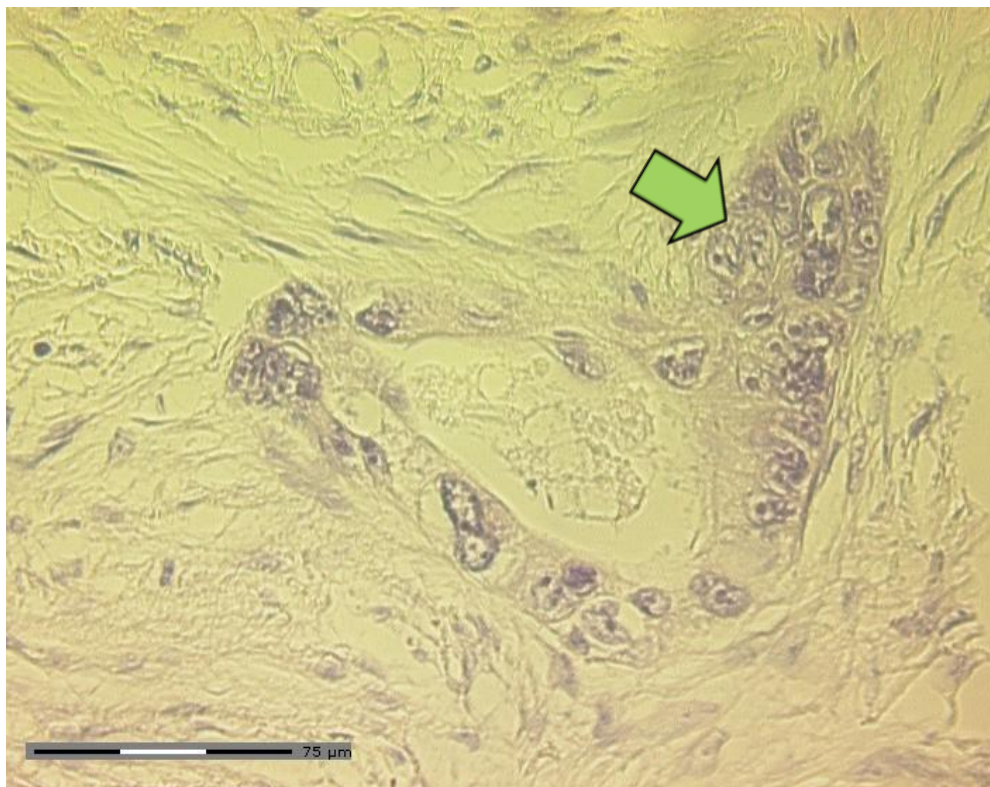
Der zweite diskrepante Fall mit der ID 101 war ein Primärtumor mit der Lokalisation im Colon ascendens. Die Tumorklassifikation befand sich im Stadium pT4N2Mx und es wurde ein Differenzierungsgrad G3 festgelegt. Zwei Tumorabschnitte (Probe A/Probe B) wurden in der Mutationsanalyse mittels Pyrosequenzierung als Wildtyp (im *KRAS*- und *BRAF*-Gen) diagnostiziert. Sowohl die synchron diagnostizierte Lymphknotenmetastase, als auch die synchron diagnostizierte Metastase im Peritoneum zeigten eine Mutation im *KRAS*-Gen an Stelle c.34G>T; G12C (Abb. 14).



**Abbildung 14: Pyrogramm: Tumor und Metastasen ID 101.** Der Tumor zeigt im *KRAS*-Gen einen Wildtypen. Die Metastase im Peritoneum und im Lymphknoten liegen im *KRAS*-Gen mit c.34G>T; G12C (siehe gelbe Pfeile) in mutierter Form vor.

#### 4.2.6 Lasermikrodissektion

Ein weiteres Verfahren zur Gewebepreparation, welches neben der manuellen Mikrodisektion zur Anwendung kam, war die Lasermikrodisektion. Zum Einsatz kam diese Methode in einem primär diskrepanten Fall. Bei diesem Fall mit der ID 23 handelte es sich um einen Tumor, welcher im Rektum lokalisiert war. Die TNM-Klassifikation wurde mit pT3N0Mx festgelegt und der Tumor befand sich im Differenzierungsgrad G2. Des Weiteren befand sich der Tumor im Zustand nach Radiochemotherapie. Zu diesem Fall konnte eine metachrone Lungenmetastase (Zeitraum der Tumordiagnose bis zur Metastasendiagnose: 8 Monate) untersucht werden. In der Vorbereitung zur DNA-Gewinnung fielen im Primärtumor einzeln verteilte Tumorareale auf (Abb. 15) auf. Großflächig, solide Tumoranteile fanden sich nicht. Dieser Umstand wurde als besondere Schwierigkeit für eine manuelle Mikrodisektion erkannt und es wurde neben einer sorgfältigen manuellen Mikrodisektion die Möglichkeit der Lasermikrodisektion evaluiert.

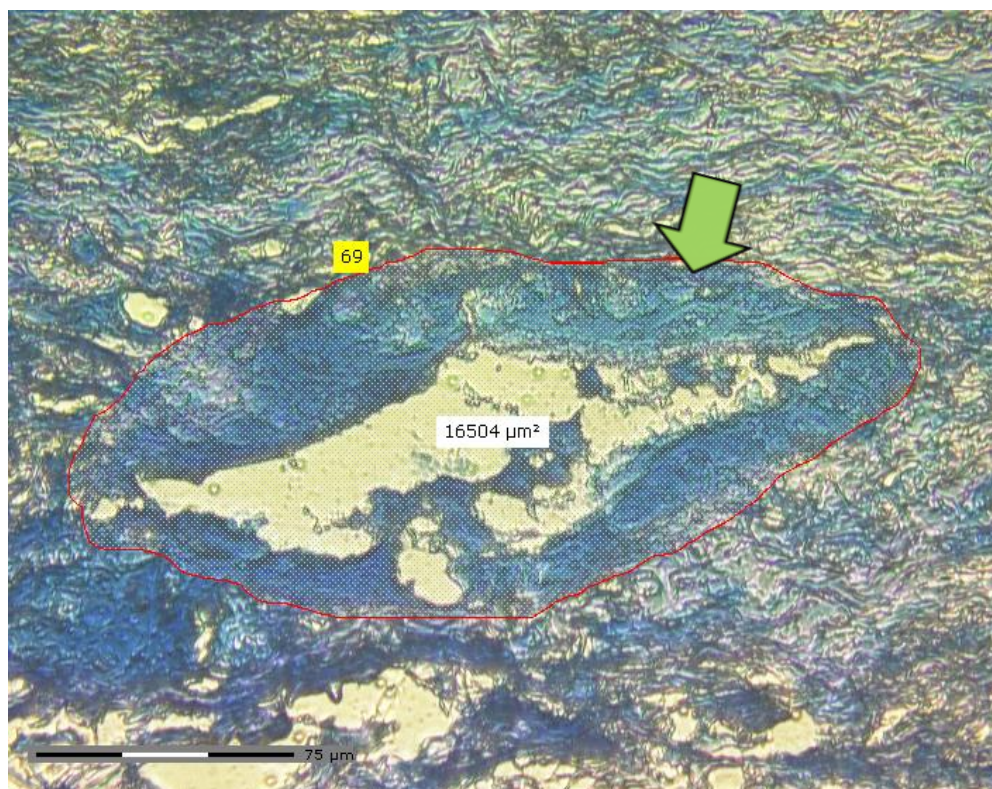


**Abbildung 15: Tumorzellareal (grüner Pfeil).** Ausschnitt des HE-Präparates (ID 23) mit Tumorzellarealen im Zustand nach Radiochemotherapie. Tumorzellareal umgeben von Stromagewebe.

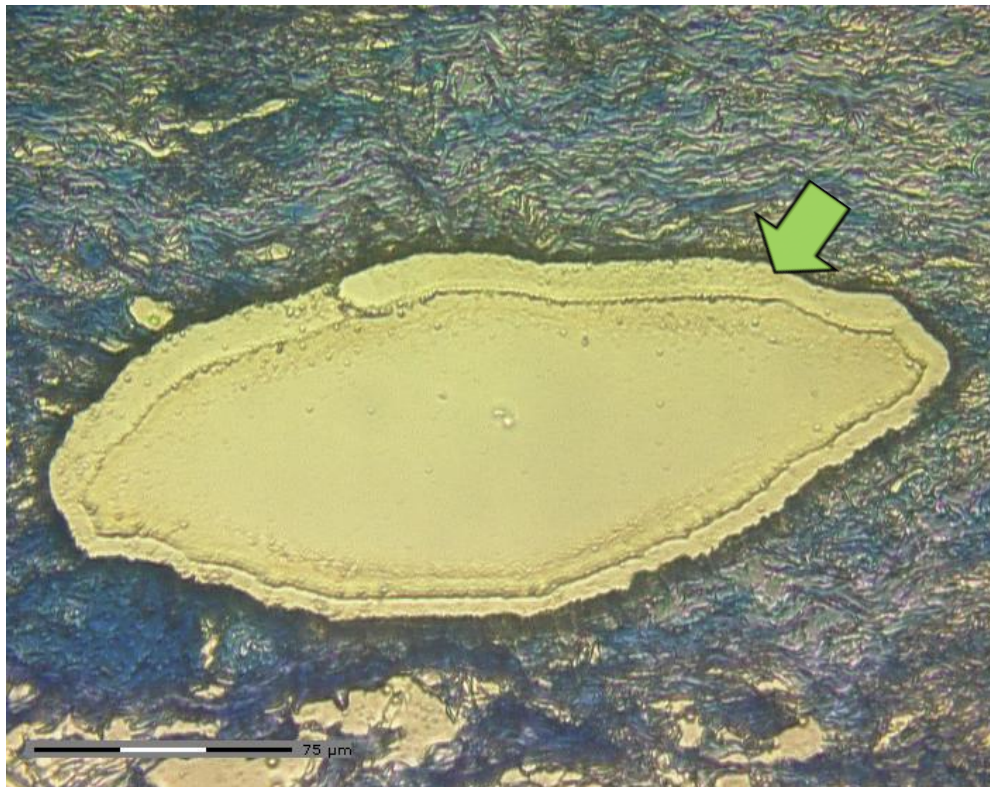


Bei dem ersten Vergleich zwischen Tumor und zugehöriger Lungenmetastase diagnostizierten wir im Tumor einen *KRAS*-Wildtyp und in der Metastase eine *KRAS*-Mutation an Stelle c.35G>A; G12D. Unter der Fragestellung, ob die Verifizierung dieser Diskrepanz durch die Verwendung der Lasermikrodissektion zu einem anderen Ergebnis führen würde, kam diese Methode zur Anwendung. Um eine Kontamination auszuschließen wurde auch das Metastasengewebe einer erneuten Mikrodissektion zugeführt.

Die Lasermikrodissektion erfolgte nach einem standardisierten Ablauf und unter Kontrolle eines Pathologen. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen das markierte Tumorareal vor der Lasermikrodissektion (Abb. 16) sowie den abladierten Bereich von dem das Tumorgewebe ausgehend (Abb. 17), mechanisch kontaktfrei in das Aufnahmegefäß katapultiert wurde.



**Abbildung 16:** Markiertes Tumorareal (grüner Pfeil) vor der Lasermikrodissektion, Methylenblaufärbung.



**Abbildung 17: Abladiertes Tumorareals (grüner Pfeil)** nach Lasermikrodissektion, Methylenblaufärbung.

Nach dem Verdau mittels ProteinaseK-Lösung erfolgte die DNA-Isolierung mittels Puregene Tissue Core Kit A von Hand sowie die *KRAS*-Mutationsbestimmung durch die Pyrosequenzierung.

Die nachfolgende Abbildung (Abb. 18) zeigt das Pyrogramm sowohl nach manueller als auch nach der Lasermikrodissektion. Die Probe nach der Lasermikrodissektion offenbart eine Mutation an Stelle c.38G>A; G13D. Diese Mutation wurde bereits zuvor in der korrespondierenden Lungenmetastase diagnostiziert. Die damit eingangs vorhandene Diskrepanz konnte im Rahmen der Verifizierung nicht bestätigt werden. Der Primärtumor wurde anhand dieses Ergebnisses als mutiert bewertet.



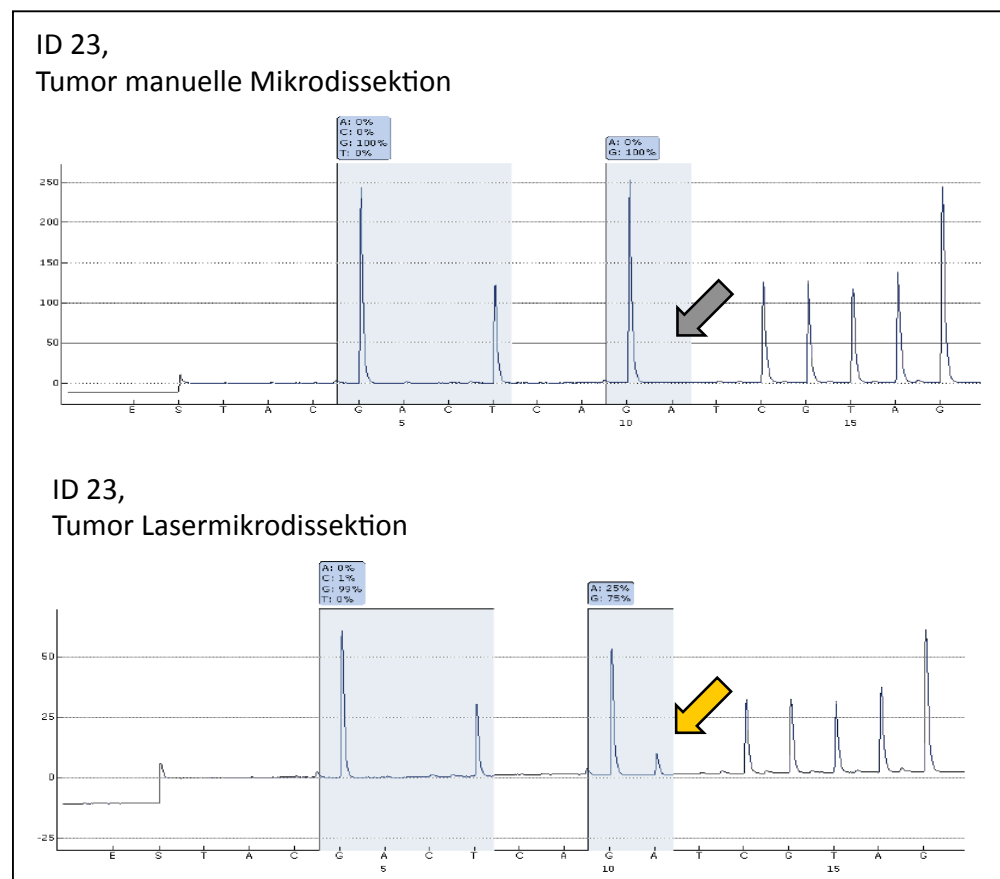


Abbildung 18: Pyrogramm nach manueller (oben) und Lasermikrodissektion (unten).

## 5 Diskussion

Die Bedeutung des *KRAS*-Gens als molekularer Prädiktor in der monoklonalen Antikörpertherapie konnte bereits in mehreren Studien erforscht werden (Khambata-Ford et al., 2007; Bokemeyer et al., 2009; Eric Van Cutsem et al., 2009a; W De Roock et al., 2008; Lièvre et al., 2006; F Di Fiore et al., 2007; Amado et al., 2008; Karapetis et al., 2008). Neben dem *KRAS*-Gen wurden auch Mutationen im *NRAS*-Gen für das Therapieansprechen verantwortlich gemacht (Peeters et al., 2013; Douillard et al., 2013).

Auf Grundlage der Daten wurde von der „European Medicines Agency“ (EMA) eine Leitlinie herausgegeben (Stand Juli 2013, [http://www.ema.europa.eu/docs/de\\_DE/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/000741/WC500047704.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000741/WC500047704.pdf)), die vorsieht, dass Patienten mit Mutationen im *KRAS*-Gen sowie im *NRAS*-Gen von der Anti-EGFR-Antikörpertherapie auszuschliessen sind (European Medicines Agency (EMA) <http://www.emea.europa.eu>).

Da sich gezeigt hat, dass nicht alle Tumoren mit *KRAS*-Wildtypen auf die EGFR-Antikörpertherapie ansprechen, wurden auch andere Biomarker untersucht, die als molekularer Prädiktor dienen könnten (J H J M van Krieken et al., 2008).

Ein weiterer Marker, der im EGFR-Signalweg eine Rolle spielt und sowohl als prognostischer Marker und Prädiktor der Anti-EGFR Therapie fungieren soll, ist neben dem *KRAS*-Gen im Kodon 61 (Molinari u. a., 2011; De Roock u. a., 2010; Loupakis u. a., 2009) das *BRAF*-Gen im Kodon 600 (Loupakis et al., 2009; Di Nicolantonio et al., 2008).

In der Routinediagnostik der Pathologie wird der *KRAS*-Mutationsstatus anhand von Primärtumorgewebe bestimmt. Hieraus hat sich dabei die Frage ergeben, ob Metastasengewebe gleichermaßen geeignet ist, um eine Aussage über den *KRAS*- bzw. *BRAF*- Mutationsstatus zu machen. Ziel dieser Arbeit war es zu Vergleichen, ob der *KRAS*- und der *BRAF*-Mutationsstatus zwischen Primärtumoren und unterschiedlich lokalisierten Metastasen, die sowohl synchron als auch metachron

zum Tumor auftreten, übereinstimmt und ob dieser bei der Betrachtung der Metastasen untereinander konstant ist.

### 5.1 *KRAS*- und *BRAF*-Mutationshäufigkeit

Wie bereits erwähnt, haben mehrerer Studien gezeigt (Amado et al., 2008; Karapetis et al., 2008; Wendy De Roock, Claes, et al., 2010; Eric Van Cutsem et al., 2009b), dass die Mutation im *KRAS*-Gen mit einem fehlenden Ansprechen auf die monoklonale Antikörpertherapie gegen den EGF-Rezeptor assoziiert ist. Diese Studien betrachten die Punktmutationen im Kodon 12 und 13 des *KRAS*-Gens, welche über 90 % der *KRAS* Mutationen ausmachen. Aus diesem Grund lag ein Fokus dieser Arbeit auf diesen beiden Genabschnitten. Die in dieser Arbeit durchgeführte Mutationsanalyse des *KRAS*-Gens im Exon 2 zeigt in den Primärtumoren eine Frequenz der *KRAS*-Mutation für Kodon 12 und 13 von 47,7%. Bei der Betrachtung der Verteilung der Mutationen im Exon 2 des *KRAS*-Gens, fanden wir in unserem Primärtumorkollektiv 70,6% der Mutationen im Kodon 12 und 29,4% im Kodon 13. Dieses entspricht dem Verhältnis vorausgegangener Studien (Molinari et al., 2011; Aude Lamy et al., 2011). Übereinstimmend mit anderen Studien (Weichert et al., 2010; Aude Lamy et al., 2011; Neumann et al., 2009; Bazan et al., 2005), diagnostizierten wir die drei häufigsten Mutationen an Stelle c.35G>A; G12D, c.38G>A; G13D und c.35G>T; G12V.

Darüber hinaus konnten wir in einem Fall eine Doppelmutation an Stelle c.35G>A & c.38G>A; G12D & G13D diagnostizieren. Im Case Report von Macedo et al. (2011) werden zwei Fälle beschrieben, in denen die Doppelmutationen an selbiger Stelle vorlag. Diese simultane Mutation im Kodon 12 und 13 des *KRAS*-Gens würde in 27% der multiplen Mutationen auftreten. Der Großteil der multiplen Mutationen (59%) befänden sich üblicherweise innerhalb des Kodon 12 (Macedo et al., 2011). Diese Doppelmutationen zeigen, dass die Tumorzellpopulation kolorektaler Karzinome im Bezug auf den *KRAS*-Mutationsstatus heterogen sein können (Macedo et al., 2011).

Die groß angelegte Studie von Amado et al. (2008) diagnostizierten im Kodon 12 und 13 des *KRAS*-Gens eine Mutationshäufigkeit von 43%. Des Weiteren fanden Karapetis et al. (2008) eine Mutationsfrequenz von 42,3% und Van Cutsem et al. (2009) in 35,6% ein mutiertes *KRAS*-Gen. Diese Studien untersuchten mehrere hundert Patienten mittels Sequenzierung nach Sanger und betrachteten ausschließlich das *KRAS*-Gen im Kodon 12 und 13. In der Arbeit von Molinari et al. (2011) wurde mittels direkter Sequenzierung nach Sanger eine Mutationshäufigkeit im Exon 2 für Kodon 12 und 13 von 39% gefunden. Durch die ergänzende Untersuchung der *KRAS*-Wildtypen mittels hoch sensitiver Untersuchungsmethoden (MALDI-TOF und eME-PCR), wurden zusätzlich 13 von 68 ursprünglichen Wildtyp-Tumoren als mutiert identifiziert, sodass *KRAS* letztlich in 55 von 111 Tumoren (49,5% ) mutiert vorlag.

Betrachtet man an dieser Stelle Arbeiten aus den Jahren 2003 bis 2011, die wie in unserer Arbeit, einen Vergleich zwischen Primärtumormutationsstatus und Metastasenmutationsstatus untersucht haben, zeigen sich Mutationshäufigkeiten im Bereich von 20% bis 52% (Baas et al., 2011). Die dabei untersuchten Fallzahlen variieren zwischen 10 bis 305 untersuchten Primärtumoren. Eine koreanische Arbeit von M.-J. Kim et al. (2012), in der auch vergleichend der *KRAS*-Mutationsstatus für Kodon 12, 13 und 61 von 143 Primärtumoren und Metastasen untersucht wurde, fand in den Primärtumoren eine Mutationshäufigkeit von 43,4%. Darüber hinaus konnten *KRAS*-Mutationen in 52,4% der Patienten unabhängig von der Lokalisation (Tumor oder Metastase) gefunden werden.

Die Auswahl des Patientenkollektivs unserer Studie erfolgte nach dem Kriterium der Verfügbarkeit von vergleichbaren Proben (Tumor versus Metastasen). Der Schwerpunkt der Arbeit lag, wie bereits erwähnt, in dem Vergleich des Mutationsstatus von Primärtumor und mindestens einer Metastase sowie bei dem Vergleich von Metastasen untereinander.

In einer Studie von Oliveira et al. (2007) lag eine signifikant höhere Frequenz an mutiertem *KRAS*-Gen in den Metastasen vor. Auch die oben erwähnte Studie von M.-J. Kim et al. (2012), fand *KRAS*-Mutationen unabhängig der Lokalisation in

52,4% der Fälle, wobei hier das Kodon 61 mit einbezogen wurde und davon in 5,3% der Fälle mutiert vorlag.

Aus diesen Arbeiten kann man schließen, dass die *KRAS*-Mutation unabhängig von der betrachteten Lokalisation häufiger zu sein scheint als jene, die aus der alleinigen Betrachtung von Primärtumoren abzuleiten ist. Diese Überlegung kann sich auch damit untermauern lassen, dass die *KRAS*-Mutationen einen Zugewinn für das Tumorwachstum und die Invasivität bedeutet (B Vogelstein et al., 1988; Fearon & B Vogelstein, 1990; Pretlow, 1995). Entsprechend übertragen auf unseren Befund, konnten wir in dem klinisch diskrepanten Fall zwar eine Mutation in der Metastase, nicht jedoch im Primärtumor ermitteln. An dieser Stelle lässt sich folgern, dass die Mutation im *KRAS*-Gen möglicherweise im Zusammenhang mit der Metastasierung zu sehen ist. Dass die *KRAS*-Mutation einen wichtigen Stellenwert im Rahmen der Karzinogenese einnimmt wurde bereits beschrieben (B Vogelstein et al., 1988; Fearon & B Vogelstein, 1990).

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Bedeutung der von uns gefundenen Mutationsfrequenz, kann in der von uns verwendeten Methode zu finden sein. Die Sequenzierung nach Sanger ist eine weit verbreitete Methode zur Identifizierung des Mutationsstatus im *KRAS*-Gen. Die Sensitivität dieser Methode liegt bei einem Anteil von mindestens 20% mutierter Allele (Malapelle et al., 2012; Querings et al., 2011; B Vogelstein & K W Kinzler, 1999). Die Pyrosequenzierung, welche bei dem Großteil in dieser Arbeit untersuchten Proben zur Anwendung kam, konnte bereits als sensitive Methode in der *KRAS*-Mutationsbestimmung bestätigt werden und zeigt bereits bei 6% mutierter Allele vorhandene Mutationen (Ibrahim et al., 2010). Auch bei dem Vergleich der Sequenzierung nach Sanger und der Pyrosequenzierung wird eine höhere Sensitivität bezüglich mutierter *KRAS*-Allele zu Gunsten der Pyrosequenzierung beschrieben (Ibrahim et al., 2010; Ogino et al., 2005). Dieser Aspekt wird vor allem dann wichtig, wenn in den zu untersuchenden Proben wenig Tumorzellen vorhanden sind (Jolien Tol et al., 2010), es im Rahmen der Mikrodissektion zu Kontaminationen mit Normal- bzw. Stromagewebe kommt oder es sich um einen heterogenen Tumor handelt (Richman et al., 2011; Baldus et al., 2010).

Zwei weitere Marker, die im EGFR-Signalweg eine Rolle spielen und sowohl als prognostischer Marker und Prädiktor der Anti-EGFR Therapie fungieren sollen, sind das *KRAS*-Gen im Kodon 61 (Molinari et al., 2011; De Roock et al., 2010; Loupakis et al., 2009) und das *BRAF*-Gen im Kodon 600 (Loupakis et al., 2009; Di Nicolantonio et al., 2008).

Die Mutationsfrequenz des *KRAS*-Gens in Kodon 61 war in unserem Patientengut ein eher seltenes Ereignis und lag in 1,8% der Primärtumoren vor. Ein ähnliches Ergebnis zeigt DeRoock et al. (2010) mit 2,1 % im Kodon 61. In der Arbeit von Molinari et al. (2011) waren 3 von 111 (2,7%) Patienten im *KRAS*-Gen Kodon 61 mutiert und in der Arbeit von Loupakis et al. (2009) lag die Mutationsfrequenz bei 8%. Insgesamt zeigen die Ergebnisse ähnliche Häufigkeiten, die demnach im Vergleich zu den Mutationen in Kodon 12 und 13 aber eher selten aufzutreten scheinen.

Bei der Betrachtung des *BRAF*-Gens im Kodon 600 zeigte sich in unserem Patientengut eine Mutationsfrequenz von 6,4%. In der Arbeit von Richman et al. (2009), in der auch die Pyrosequenzierung zur Mutationsanalyse verwendet wurde, fanden sich in 56 von 711 (7,9%) der Fälle eine Mutation im *BRAF*-Gen. Die Pyrosequenzierung zeigte bei Baldus et al. (2010) für *BRAF* eine Mutationsfrequenz von 7%. Artale et al. (2008) fand in einer vergleichenden Arbeit (Tumor versus Metastase) mittels Sequenzierung nach Sanger eine *BRAF* Mutationshäufigkeit von 4%.

Aufgrund der Datenlage, dass die Mutationen im *KRAS*-Gen im Kodon 12, 13 und 61, aber auch im *BRAF*-Gen sich gegenseitig ausschließen (Douillard et al., 2013; F Loupakis et al., 2009; Jolien Tol et al., 2009; Rajagopalan et al., 2002b) und vor allem die Mutationen im *KRAS*-Gen Kodon 61 und im *BRAF*-Gen Kodon 600 seltener auftreten, ist die Testung des Kodon 61 und *BRAF* Kodon 600 besonders bei den *KRAS* Kodon 12 und 13 Wildtypumoren sinnvoll.

Die bei uns beschriebene Diskrepanz (vgl. 4.2.5) zwischen Tumormutationsstatus und Metastasenmutationsstatus, konnte in einem Fall über eine Lasermikrodissektion geklärt werden. Der Fall mit der Doppelmutation zeigt auch in unserem Kollektiv,

dass Heterogenität innerhalb des Tumors vorhanden ist. Diese konnte aber letztlich in der einfach mutierten Metastase nicht gefunden werden. Klinische Relevanz zeigte ein Wildtyp-Tumor mit mutierter Metastase. Heterogenität innerhalb des Tumors konnte durch die Analyse weiterer Tumorabschnitte nicht gefunden werden.

## 5.2 *KRAS*- und *BRAF*- Mutationstatus: Tumor versus Metastase

Ein Großteil der Patienten mit kolorektalen Karzinomen profitieren nicht von der Anti-EGFR-Therapie, obgleich dessen Primärtumoren im *KRAS*-Gen eine Wildtypsequenz aufweisen. Neben der Suche nach weiteren Markern, ist die Untersuchung möglicher Diskrepanzen im Mutationsstatus der Metastasen von Wildtyp-tumoren, ein denkbarer Erklärungsversuch bezüglich des Therapieversagens.

Ein Modell von Klein (2009) beschreibt die parallele, unabhängige Entwicklung von Primärtumor und Metastasen, aufgrund früh ausgesäter Tumorzellen, bevor ein vollständiger maligner Phänotyp entsteht. Entsprechend diesem Modell ließen sich Diskrepanzen im Mutationsstatus zwischen Primärtumor und Metastasen erklären.

Bei dem Vergleich zwischen dem *KRAS*- und *BRAF*-Mutationsstatus von Primärtumoren und Metastasen, zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine Gesamtübereinstimmung von 98,2% (107/109) und eine klinisch relevante Übereinstimmung von 99,1% (108/109) (vgl. 4.2.3). Vergleichbare Arbeiten, die ebenfalls den Tumormutationsstatus und den Metastasenmutationsstatus miteinander verglichen haben (Watanabe et al., 2011; Knijn et al., 2011; Baas et al., 2011; Baldus et al., 2010; Daniele Santini et al., 2008; Gattenlöhner et al., 2009; Artale et al., 2008), zeigten im Mittel Übereinstimmungen von 93% (von 76% bis 100%) und somit eine ähnlich hohe Übereinstimmungsrate wie in unserer Arbeit.

In der Arbeit von Arbeit von Knijn et al. (2011) wurden 305 Primärtumoren mit entsprechenden Lebermetastasen verglichen. Die Übereinstimmungsrate im *KRAS*-Gen Kodon 12 und 13 lag bei 96,4% und zeigte sich entsprechend in 3,6% der Fälle nicht konkordant. Zu den diskrepanten Fällen zählten sowohl synchrone, als auch metachrone Lebermetastasen. Von den elf diskrepanten Fällen zeigten jedoch nur

sechs klinische Relevanz (2% klinische Diskrepanz). Hier zeigt sich, dass je höher die Fallzahl der Studie, es zu einer Reduktion der diskrepanten Fälle im Mutationsstatus kommt.

Im Weiteren stellt sich die Frage, ob sich darüber hinaus der Mutationsstatus von verschiedenen Metastasen in selben Patienten untereinander unterscheidet. In der Übersichtsarbeit von Baas et al. (2011) wird argumentiert, dass es bei einem unterschiedlichen Mutationstatus von Primärtumor und Metastasen nicht gesagt sei, ob sich dieser auch auf den Status anderer Metastasen übertragen ließe. Auf die vorliegenden Daten bezogen, können wir zeigen, dass der Mutationsstatus der Metastasen eines Falles bzw. des jeweiligen Patienten untereinander gleichbleibend ist bzw. zu 100% übereinstimmt. Dieses Ergebnis zeigt auch die Arbeit von Watanabe et al. (2011). Die in unserer Arbeit untersuchten Lymphknotenmetastasen (n=51), konnten bei 46 Patienten mit Fernmetastasen, wie beispielweise Leber- und Lungenmetastasen, verglichen werden. Diese in der aktuellen Diskussion wenig untersuchten Lymphknotenmetastasen zeigten bei genauer Mikrodisektion verlässliche Ergebnisse und waren in dieser Arbeit mit einer vollständigen Übereinstimmung im *KRAS*- und *BRAF*-Mutationsstatus bezogen auf weitere Metastasen innerhalb eines Patienten assoziiert.

Sollte sich im Rahmen weiterführender Studien zeigen, dass es empfehlenswert sein könnte, zusätzliches Metastasenmaterial zu untersuchen, so wäre abgeleitet von unseren Daten ein zusätzlicher invasiver Eingriff zur Gewebegewinnung bei eindeutigen bildgebenen Verfahren nicht notwendig. Hier ermöglicht, das im Rahmen der Tumorresektion entnommene Lymphknotenmaterial, eine ebenso zuverlässige Aussage über den Mutationsstatus der Metastasen.

Die klinisch relevante Übereinstimmung dieser Arbeit lag bei 99,1%. In einem Fall (0,9%) zeigte sich eine klinisch relevante Diskrepanz. Hierbei lag der Primärtumor im *KRAS*- sowie im *BRAF*-Gen als Wildtyp vor (vgl. 4.2.5). Die zugehörigen Metastasen im Lymphknoten und im Peritoneum zeigten jeweils eine Mutation im *KRAS*-Gen an Stelle c.34G>T; G12C. Ein weiterer Fall zeigte im Primärtumor eine Doppelmutation, die zugehörige Lungenmetastase war jedoch einfach mutiert (vgl. 4.2.5). Auch die Verifizierung mittels wiederholter Mutationsanalyse bestätigte die



vorliegenden Ergebnisse. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Übereinstimmungsrate des *KRAS*- und *BRAF*-Mutationsstatus überaus stabil zu sein scheint und auch bei synchronen und metachronen Metastasen keine relevanten Unterschiede festzustellen sind (vgl. 4.1.9). Jedoch deuten diese seltenen diskrepanten Befunde im Mutationsstatus zwischen Primärtumor und Metastasen darauf hin, dass ein homogenes genetisches Profil, wie von Fearon & Vogelstein (1990) ursprünglich für kolorektale Karzinome annahm, nicht vollständig auf die zusätzliche Betrachtung von Metastasen zutrifft. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Mutation im *KRAS*-Gen auch im Verlauf der Metastasierung auftreten können (Albanese et al., 2004; Zauber et al., 2003).

In unserer Arbeit konnten bei vier Patienten weitere Zweittumoren untersucht werden. Diese lagen im *KRAS*-Gen mutiert vor und zeigten den gleichen Mutationsstatus wie die zugehörigen Primärtumore. Diskrepanzen im untersuchten Mutationsstatus zwischen verschiedenen Tumoren, wie an anderer Stelle beschrieben (Aude Lamy et al., 2011), konnten wir demnach nicht feststellen.

Letztlich kann aus unseren Daten abgeleitet werden, dass nicht nur durch die Untersuchung weiterer Tumorabschnitte, sondern vielmehr die, falls verfügbar, zusätzliche Untersuchung von Metastasenmaterial die Zuverlässigkeit des Mutationsstatus verbessern kann. Inwieweit ein diskrepanter Fall wie oben beschrieben sich im Zusammenhang mit dem Ansprechen bzw. Therapieversagen der Anti-EGFR-Therapie verhält, sollte in weiterführenden Studien erarbeitet werden.

### 5.2.1 Tumorheterogenität

In verschiedenen Arbeiten wurde nicht nur ein Vergleich zwischen Primärtumor und den unterschiedlichen Metastasen angestrebt, sondern es wurde auch untersucht, ob innerhalb des Tumors ein unterschiedlicher *KRAS*- und *BRAF*-Mutationsstatus vorhanden ist (Baldus et al., 2010; Watanabe et al., 2011; Aude Lamy et al., 2011; Richman et al. 2011). Tumorheterogenität könnte ein weiterer Ansatzpunkt zur Klärung des Versagens der Anti-EGFR Therapie eines Patiententeils sein. Darüber hinaus könnten sich damit die seltenen diskrepanten Fälle, im Rahmen einer

möglichen klonalen Selektion, zwischen Tumormutationstatus und Metastasenmutationsstatus begründen lassen.

In der Arbeit von Richman et al. (2011) über intratumorale Heterogenität des *KRAS*- und *BRAF*-Mutationsstatus in fortgeschrittenen kolorektalen Karzinomen, wurde eine *KRAS*-Mutationshäufigkeit in den 69 untersuchten Primärumoren in Kodon 12 und 13 von 46,4% gefunden. Das *KRAS*-Gen im Kodon 61 lag in 2,8% der Fälle mutiert vor und *BRAF* im Kodon 600 in 11,6% der Fälle. Es wurden mindestens zwei Tumorblöcke desselben Tumors mittels Pyrosequenzierung untersucht. Diese verschiedenen Tumorblöcke zeigten in 92,8% denselben Mutationsstatus an. In 7 (10,1%) Patientenproben war der erstmalig untersuchte Tumorblock ein Wildtyp und je ein weiterer Tumorblock des jeweiligen Patienten war mutiert. Dieser Zustand würde als heterogen bezeichnet werden. Ein DNA-Mix aus jeweils allen zu Verfügung stehenden Tumorblöcken wurde erstellt und der Mutationsanalyse zugeführt. Alle 7 DNA-Mix Proben zeigten anschließend eine Mutation.

Die Empfehlung, die Richman et al. (2011) daraus ableitet ist, dass durch die zusätzliche Analyse von Tumorblöcken mehr Mutationen, bedingt durch die Heterogenität gefunden werden könnten. Diese Aussage wurde auch in der Arbeit von Baldus et al. (2010) deutlich, dass eine Reduktion der von Ihnen gefundenen Heterogenität in Tumoren, durch die Untersuchung weiterer Tumorabschnitte erzielt werden konnte. Er argumentiert, dass ein Grund des Versagens der Anti-EGFR-Therapie in falsch negativen Ergebnissen, durch Heterogenität innerhalb der Tumoren, bedingt sein könne.

Die Arbeiten von Baldus et al. (2010) und Watanabe et al. (2011) konnten ebenfalls Heterogenität innerhalb des Tumors bezogen auf den *KRAS*-Mutationsstatus feststellen. Hier wurden verschiedene Tumorabschnitte eines Tumorblockes auf den *KRAS*-Mutationsstatus untersucht. Im Vergleich dazu, wurde bei unserer Studie der gesamte Tumor eines Tumorblockes der Mutationsanalyse zugeführt. Eine weitere Unterscheidung in Tumorzentrum und Invasionsfront, wie bei den genannten Studien wurde in unserer Arbeit nicht durchgeführt. Die Mikrodissektion erfolgte analog dem Vorgehen, welches in der Routinediagnostik der molekularpathologischen Diagnostik

der Universität Regensburg im Rahmen der *KRAS*-Mutationsbestimmung vorgenommen wird.

Es zeigt sich in der Studie von Losi et al. (2005) eine lineare Reduktion der Heterogenität innerhalb des Tumors, von niedrigen zu hohen Tumorstadien. Dies spricht dafür, dass in höheren Tumorstadien die *KRAS*-Mutation mit einer höheren Zuverlässlichkeit analysiert werden kann, wenn bei der Probengewinnung, der gesamte Tumor zur DNA-Gewinnung verwendet wird. Losi et al. (2005) macht deutlich, dass die Untersuchung eines kleinen Teils des Tumors nicht für den Mutationsstatus des gesamten Tumors sprechen könne. Somit kann Tumorerheterogenität, abhängig von der Sensitivität der Untersuchungsmethode, eventuell zu falsch negativen Ergebnissen führen. Das von uns untersuchte Tumorkollektiv befand sich überwiegend in hohen Tumorstadien bzw. im T-Status pT3 oder pT4 (89,9% vgl. 4.1.1). Dieses spricht, abgeleitet von der genannten Studie dafür, dass eine mögliche Heterogenität innerhalb der Tumoren seltener wäre. Dies kann ein Erklärungsansatz für die in unserer Studie gefundene hohe Übereinstimmung sein. Ebenso könnte es eine Erklärung für die mit 47,7%, im Vergleich zu unselektierten Tumorkollektiven, höhere *KRAS*-Mutationsfrequenz darstellen.

Abhängig von der Sensitivität der Untersuchungsmethode (vgl. 5.1) lässt sich somit diskutieren, ob für die Routinediagnostik abgeleitet werden kann, dass Tumoren in hohen Tumorstadien weniger anfällig für falsch negative Ergebnisse sind, als Tumoren niedriger Tumorstadien. Im Umkehrschluss könnte man damit ableiten, dass Mutationsergebnisse von Tumoren niedriger Stadien möglicherweise kritischer beurteilt werden sollten.

Inwieweit diese intratumorale Heterogenität einen Einfluss auf das Ansprechen bzw. fehlendes Ansprechen auf die EGFR-Antikörpertherapie hat, könnte in weiterführenden Studien zu klären sein (Jolien Tol et al., 2010; Bando et al., 2011; Molinari et al., 2011; Daniele Santini et al., 2011). Weiterführend könnte evaluiert werden, ob eine Therapieentscheidung anhand der Metastasen zu einem veränderten Ergebnis kommen würde.

### 5.3 Mikrodissektion

Eine wichtige methodische Rolle nahm in dieser Arbeit die Mikrodissektion ein. Es hat sich im Rahmen dieser Arbeit gezeigt (vgl. 4.2.6), dass die Mikrodissektion einen wichtigen Stellenwert hat, um verlässliche Daten gewinnen zu können. Dies zeigte sich besonders deutlich beispielsweise bei Tumoren im Zustand nach neoadjuvanter Radiochemotherapie oder Tumoren mit großen Anteilen extrazellulärer Verschleimung. Hier war das genaue Markieren der Tumorzellverbände auf einem „HE-Schnitt“ entscheidend, um falsch negativen Ergebnissen vorzubeugen. Auch bei den bislang wenig untersuchten Lymphknoten, lag die Herausforderung darin, das oft nur wenig vorhandene Metastasenmaterial für die Gewinnung von ausreichender DNA zu extrahieren, ohne dieses mit „Normalgewebe“ oder Stromagewebe zu kontaminieren. Vorrangig wurde hierfür die manuelle Mikrodissektion (vgl. 3.1.1) verwendet, welche bei Bedarf unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops optimiert werden konnte.

An diesem Punkt ist der Fall mit der ID 23 aus unserem Patientenkollektiv zu nennen. Hierbei handelte es sich um einen zuvor diskrepanten Fall der mit Hilfe einer Lasermikrodissektion sich als nicht diskrepant herausstellte. In diesem Fall wurden nicht verschiedene Tumorabschnitte untersucht, sondern die nach der Radiochemotherapie gering vorhandenen disseminierten Tumorzellverbände der Mutationsanalyse zugeführt (vgl. 4.2.6). Dieser Fall zeigt damit die Schwierigkeit auf, die in der Routinediagnostik bzw. bei der Mutationsanalyse an Primärtumoren auftreten kann, wenn wenig repräsentatives Tumorgewebe zur Verfügung steht. Eine weitere Unterscheidung in Tumorzentrum und Invasionsfront ist dabei nicht möglich. Die Zuverlässigkeit der Mutationsanalyse hängt in diesen Fällen auch von der Mikrodissektion ab. Sofern vorhanden, ist hier die Testung weiterer Tumoranschnitte bzw. der Metastasen sinnvoll.

Die Lasermikrodissektion bietet, wie in diesem Fall gezeigt, die Möglichkeit disseminierte Zellverbände oder morphologische Inhomogenität differenziert einer Mutationsanalyse mittels PCR zuzuführen (Watanabe et al., 2011; Bazan et al., 2005). Wie auch an anderer Stelle beschrieben (Hernández & Lloreta, 2006) hat sich,

abgesehen von diesen genannten Ausnahmefällen, die manuelle Mikrodisektion als einfache und zuverlässige Methode zur Isolierung von homogenen Tumor- oder Metastasenzellverbänden herausgestellt.

## 6 Zusammenfassung

In der monoklonalen Antikörpertherapie mittels Cetuximab und Panitumumab werden prätherapeutisch entsprechend der Datenlage, den Empfehlungen und letztlich aufgrund der Medikamentenzulassung der *RAS*-Mutationsstatus (*NRAS/KRAS*) von kolorektalen Karzinomen bestimmt. Dieser wird im Sinne eines prädiktiven Markers verwendet. Es konnte in Studien gezeigt werden, dass nur diejenigen Patienten von einer monoklonalen Antikörpertherapie mittels Cetuximab und Panitumumab profitieren, welche in den *RAS*-Genen (*NRAS* und *KRAS*) einen Wildtyp aufweisen. Patienten die im *KRAS*- oder *NRAS*-Gen eine Mutation aufwiesen, hatten dagegen kein signifikant verbessertes progressionsfreies bzw. Gesamtüberleben (Peeters et al., 2013; Douillard et al., 2013). Neben der Bestimmung des *KRAS*-Mutationsstatus wird aktuell zusätzlich auch der *NRAS*-Mutationsstatus ermittelt.

Ziel dieser Arbeit war es den Status der *KRAS*-Mutationen, welche den Hauptanteil der potentiellen Mutationen ausmacht, von Primärtumoren und ihren jeweils korrespondierenden Metastasen zu vergleichen. Dieser Vergleich sollte zum einen anhand verschieden lokalisierter Metastasen und zum anderen an synchron und metachron zum Primärtumor identifizierten Proben erfolgen.

In der vorliegenden Arbeit wurden 284 DNA-Proben von Tumoren und Metastasen kolorektaler Karzinome auf ihren *KRAS*-Mutationsstatus hin untersucht. Die hier untersuchten Metastasen konnten unterschieden werden in Lymphknotenmetastasen (n=51), Lebermetastasen (n=55), Metastasen im Peritoneum (n=34) sowie Lungenmetastasen (n=15). Des Weiteren wurden Metastasen im Ovar (n=5), Hirn (n=4), Harnblase (n=2), Ureter (n=2), Haut (n=1) und Knochen (n=1) mit einbezogen. In Tumoren, welche im *KRAS*-Gen einen Wildtyp zeigten (n=55), wurde zusätzlich der *BRAF*-Mutationsstatus bestimmt. Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden bedienten sich der Sequenzierung nach Sanger sowie der Sequenzierung mittels PyroMark Q24. Ein zentraler Punkt dieser Arbeit stellte die Mikrodissektion dar. Neben der manuellen Mikrodissektion, war die Lasermikrodissektion eine probate Methode zur Gewinnung von DNA aus „kritischen“ Gewebeproben.

Es konnte gezeigt werden, dass der Mutationsstatus im *KRAS*-Gen und *BRAF*-Gen zwischen Primärtumor und korrespondierenden Metastasen als konsistent anzusehen war. Es besteht, abgeleitet von unseren Daten, eine nahezu vollständige Übereinstimmung 98,2% (107/109) im untersuchten Mutationsstatus, unabhängig vom Zeitintervall der Vergleichsproben und von ihrer Lokalisation. Dieses entspricht dem Großteil der Ergebnisse vorausgegangener Arbeiten (Konkordanzbereich von 76% bis 100%, siehe zusammenfassende Übersichtsarbeit: Baas et al., 2011).

Neben Mutationen in den *RAS*-Genen scheinen Mutationen in weiteren Genen wie beispielsweise *BRAF* und *PIK3CA* eine prädiktive Rolle in der monoklonalen Antikörpertherapie einzunehmen. Diese können damit einen Erklärungsansatz für einen Teil der Therapieversager liefern. Diskrepanzen zwischen Tumor und Metastasen im Bezug auf den *KRAS/BRAF*-Mutationsstatus kommen in der vorliegenden Arbeit und auch in anderen Studien (Watanabe et al., 2011; Baldus et al., 2010; Gattenlöhner et al., 2009) jedoch vergleichsweise selten vor und scheinen daher auf das Therapieansprechen allenfalls einen geringen Einfluss zu haben.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass aufgrund der hohen Konkordanz zwischen Primärtumor und Metastasen im *KRAS/BRAF*-Mutationsstatus in der diagnostischen Routine die Untersuchung von Metastasengewebe kolorektaler Karzinome bei fehlender Verfügbarkeit des Primärtumors bzw. mangelndem Tumormaterials, eine zuverlässige Möglichkeit zur Evaluation des Mutationsstatus des Primärtumors darstellen kann.

## 7 Literaturverzeichnis

Albanese, I., Scibetta, A.G., Migliavacca, M., Russo, A., Bazan, V., Tomasino, R.M., Colomba, P., Tagliavia, M. & La Farina, M. (2004) Heterogeneity within and between primary colorectal carcinomas and matched metastases as revealed by analysis of Ki-RAS and p53 mutations. *Biochemical and biophysical research communications*, 325 (3), p.pp.784–791.

Almoguera, Concepcion, Shibata, D., Forrester, Kathleen, Martin, J., Arnheim, N. & Perucho, Manuel (1988) Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-RAS genes. *Cell*, 53 (4), p.pp.549–554. Available from: [Accessed 25 January 2013].

Amado, R.G., Wolf, M., Peeters, Marc, Van Cutsem, Eric, Siena, S., Freeman, D.J., Juan, T., Sikorski, R., Suggs, S., Radinsky, R., Patterson, S.D. & Chang, D.D. metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26 (10), p.pp.1626–1634. Available from: [Accessed 27 March 2010].

Artale, S., Sartore-Bianchi, A., Veronese, S.M., Gambi, V., Sarnataro, C.S., Gambacorta, M., Lauricella, C. & Siena, S. (2008) Mutations of *KRAS* and *BRAF* in primary and matched metastatic sites of colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26 (25), p.pp.4217–4219. Available from: [Accessed 26 March 2010].

Baas, J.M., Krens, L.L., Guchelaar, H.-J., Morreau, H. & Gelderblom, H. (2011) Concordance of Predictive Markers for EGFR Inhibitors in Primary Tumors *Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 16 (3), p.pp.790–799. Available from: [Accessed 26 March 2010].

Bando, H., Yoshino, T., Tsuchihara, K., Ogasawara, N., Fuse, N., Kojima, T.,



- Tahara, M., Kojima, M., Kaneko, K., Doi, T., Ochiai, A., Esumi, H. & Ohtsu, A. (2011) *KRAS* mutations detected by the amplification refractory mutation system-Scorpion assays strongly correlate with therapeutic effect of cetuximab. *British journal of cancer*, 105 (3), p.pp.403–406.
- Bazan, V., La Rocca, G., Corsale, S., Agnese, V., Macaluso, M., Migliavacca, M., Gregorio, V., Cascio, S., Sisto, P.S., Di Fede, G., Buscemi, M., Fiorentino, E., Passantino, R., Morello, V., Tomasino, R.M. & Russo, A. (2005) Laser pressure catapulting (LPC): optimization LPC-system and genotyping of colorectal carcinomas. *Journal of Cellular Physiology*, 202 (2), p.pp.503–509. Available from: [Accessed 4 September 2011].
- Beach, R., Chan, A.O.-O., Wu, T.-T., White, J.A., Morris, J.S., Lunagomez, S., Broadus, R.R., Issa, J.-P.J., Hamilton, Stanley R & RAShid, A. (2005) *BRAF* mutations in aberrant crypt foci and hyperplastic polyposis. *The American journal of pathology*, 166 (4), p.pp.1069–1075.
- Bisgaard, M.L., Fenger, K., Bülow, S., Niebuhr, E. & Mohr, J. (1994) Familial adenomatous polyposis (FAP): Frequency, penetrance, and mutation rate. *Human Mutation*, 3 (2), p.pp.121–125. Available from: [Accessed 15 December 2012].
- Boese-Landgraf, J. (1998) Epidemiologie, Vorstufen und Pathogenese des kolorektalen Karzinoms. *Der Onkologe*, 4 (13), p.pp.S2–S4. Available from: [Accessed 14 December 2012].
- Boguski, M.S. & McCormick, F. (1993) Proteins regulating *RAS* and its relatives. , *Published online: 16 December 1993; | doi:10.1038/366643a0*, 366 (6456), p.pp.643–654. Available from: [Accessed 22 January 2013].
- Bokemeyer, C., Bondarenko, I., Makhson, A., Hartmann, J.T., Aparicio, J., De Braud, F., Donea, S., Ludwig, Heinz, Schuch, G., Stroh, C., Loos, A.H., Zube, A. & Koralewski, P. (2009) Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal

- cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27 (5), p.pp.663–671.
- Bos, J.L. (1989) *RAS* oncogenes in human cancer: a review. *Cancer research*, 49 (17), p.pp.4682–4689.
- Bos, J.L., Fearon, E.R., Hamilton, S R, Verlaan-de Vries, M., Van Boom, J.H., Van der Eb, A.J. & Vogelstein, B (1987) Prevalence of *RAS* gene mutations in human colorectal cancers. *Nature*, 327 (6120), p.pp.293–297.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. & McCormick, F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, 349 (6305), p.pp.117–127. Available from: [Accessed 22 January 2013].
- Bülow, S. (1986) Clinical features in familial polyposis coli. *Diseases of the Colon & Rectum*, 29 (2), p.pp.102–107. Available from: [Accessed 15 December 2012].
- Cejas, P., López-Gómez, M., Aguayo, C., Madero, R., De Castro Carpeño, J., Belda-Iniesta, C., Barriuso, J., Moreno García, V., Larrauri, J., López, R., Casado, E., Gonzalez-Barón, M. & Feliu, J. (2009) *KRAS* mutations in primary colorectal cancer tumors and related metastases: a potential role in prediction of lung metastasis. *PloS one*, 4 (12), p.p.e8199.
- Chung, D.C. & Rustgi, A.K. (2003) The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Annals of internal medicine*, 138 (7), p.pp.560–570.
- Cunningham, D., Humblet, Yves, Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, C., Chau, I. & Van Cutsem, Eric (2004a) Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*, 351 (4), p.pp.337–345.

- Cunningham, D., Humblet, Yves, Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, C., Chau, I. & Van Cutsem, Eric (2004b) Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*, 351 (4), p.pp.337–345.
- Van Cutsem, Eric, Köhne, C.-H., Hitre, E., Zaluski, J., Chang Chien, C.-R., Makhson, A., D’Haens, G., Pintér, T., Lim, R., Bodoky, G., Roh, J.K., Folprecht, G., Ruff, P., Stroh, C., Tejpar, Sabine, Schlichting, M., Nippgen, J. & Rougier, P. (2009a) Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*, 360 (14), p.pp.1408–1417.
- Van Cutsem, Eric, Köhne, C.-H., Hitre, E., Zaluski, J., Chang Chien, C.-R., Makhson, A., D’Haens, G., Pintér, T., Lim, R., Bodoky, G., Roh, J.K., Folprecht, G., Ruff, P., Stroh, C., Tejpar, Sabine, Schlichting, M., Nippgen, J. & Rougier, P. (2009b) Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*, 360 (14), p.pp.1408–1417.
- Van Cutsem, Eric, Peeters, Marc, Siena, S., Humblet, Yves, Hendlisz, A., Neyns, B., Canon, J.-L., Van Laethem, Jean-Luc, Maurel, J., Richardson, G., Wolf, M. & Amado, R.G. (2007) Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25 (13), p.pp.1658–1664.
- Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., et al. (2002) Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. *Nature*, 417 (6892), p.pp.949–954.
- Douillard, J.-Y., Oliner, K.S., Siena, S., Tabernero, J., Burkes, R., Barugel, M., Humblet, Y., Bodoky, G., Cunningham, D., Jassem, J., Rivera, F., Kocáková, I., Ruff, P., Błasińska-Morawiec, M., Šmakal, M., Canon, J.L., Rother, M.,

- Williams, R., Rong, A., Wiezorek, J., Sidhu, R. & Patterson, S.D. (2013) Panitumumab-FOLFOX4 treatment and *RAS* mutations in colorectal cancer. *The New England journal of medicine*, 369 (11), p.pp.1023–1034.
- Fearon, E.R. (1993) K-*RAS* gene mutation as a pathogenetic and diagnostic marker in human cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 85 (24), p.pp.1978– 1980.
- Fearon, E.R. & Vogelstein, B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61 (5), p.pp.759–767. Available from: [Accessed 21 September 2011].
- Di Fiore, F, Blanchard, F, Charbonnier, F., Le Pessot, F, Lamy, A, Galais, M.P., Bastit, L., Killian, A., Sesboué, R, Tuech, J.J., Queuniet, A.M., Paillot, B., Sabourin, J.C., Michot, F., Michel, P. & Frebourg, T. (2007) Clinical relevance of *KRAS* mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. *British Journal of Cancer*, 96 (8), p.pp.1166–1169. Available from: [Accessed 17 August 2011].
- Flaherty, K.T., Puzanov, I., Kim, K.B., Ribas, A., McArthur, G.A., Sosman, J.A., O'Dwyer, P.J., Lee, R.J., Grippo, J.F., Nolop, K. & Chapman, P.B. (2010) Inhibition of mutated, activated *BRAF* in metastatic melanoma. *The New England journal of medicine*, 363 (9), p.pp.809–819.
- Forrester, K, Almoguera, C, Han, K., Grizzle, W.E. & Perucho, M (1987) Detection of high incidence of K-*RAS* oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature*, 327 (6120), p.pp.298–303.
- Gattenlöhner, S., Etschmann, B., Kunzmann, V., Thalheimer, A., Hack, M., Kleber, G., Einsele, H., Germer, C & Müller-Hermelink, H.-K. (2009) Concordance of *KRAS/BRAF* Mutation Status in Metastatic Colorectal Cancer before and after Anti-EGFR Therapy. *Journal of Oncology*, 2009, p.p.831626. Available from: [Accessed 26 March 2010].
- Gattenlohner, S., Germer, Christoph & Muller-Hermelink, H.-K. (2009) K-*RAS*

- mutations and cetuximab in colorectal cancer. *The New England journal of medicine*, 360 (8), p.p.835; author reply 835–836.
- Graziano, S.L., Gamble, G.P., Newman, N.B., Abbott, L.Z., Rooney, M., Mookherjee, S., Lamb, M.L., Kohman, L.J. & Poiesz, B.J. (1999) Prognostic significance of K-RAS codon 12 mutations in patients with resected stage I and II non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 17 (2), p.pp.668–675
- Hernández, S. & Lloreta, J. (2006) Manual versus laser micro-dissection in molecular biology. *UltraStructural Pathology*, 30 (3), p.pp.221–228. Available from: [Accessed 21 August 2011].
- Holbro, T., Civenni, G. & Hynes, N.E. (2003) The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Experimental cell research*, 284 (1), p.pp.99–110.
- Holbro, T. & Hynes, N.E. (2004) ERBB RECEPTORS: Directing Key Signaling Networks Throughout Life. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44 (1), p.pp.195–217. Available from: [Accessed 16 January 2013].
- Hoshino, R., Chatani, Y., Yamori, T., Tsuruo, T., Oka, H., Yoshida, O., Shimada, Y., Ari-i, S., Wada, H., Fujimoto, J. & Kohno, M. (1999) Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene*, 18 (3), p.pp.813–822.
- Houben, R., Becker, J.C., Kappel, A., Terheyden, P., Bröcker, E.-B., Goetz, R. & Rapp, U.R. (2004) Constitutive activation of the RAS-Raf signaling pathway in metastatic melanoma is associated with poor prognosis. *Journal of carcinogenesis*, 3 (1), p.p.6.
- Ibrahim, S., Seth, R., O’Sullivan, B., Fadhil, W., Taniere, P. & Ilyas, Mohammad (2010) Comparative analysis of pyrosequencing and QMC-PCR in conjunction with high resolution melting for KRAS/BRAF mutation detection. *International Journal of Experimental Pathology*, 91 (6), p.pp.500–

505. Available from: [Accessed 24 August 2011].

Ilyas, M., Straub, J., Tomlinson, I.P.M. & Bodmer, W.F. (1999) Genetic pathways in colorectal and other cancers. *European Journal of Cancer*, 35 (3), p.pp.335–351. Available from: [Accessed 17 December 2012].

Jakob, J.A., Bassett, R.L., Jr, Ng, C.S., Curry, J.L., Joseph, R.W., Alvarado, G.C., Rohlf, M.L., Richard, J., Gershenwald, J.E., Kim, K.B., Lazar, A.J., Hwu, P. & Davies, M.A. (2012) *NRAS* mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. *Cancer*, 118 (16), p.pp.4014–4023.

Kahi, C.J., Rex, D.K. & Imperiale, T.F. (2008) Screening, surveillance, and primary prevention for colorectal cancer: a review of the recent literature. *Gastroenterology*, 135, p.pp.380–399.

Karapetis, C.S., Khambata-Ford, S., Jonker, D.J., O’Callaghan, C.J., Tu, D., Tebbutt, N.C., Simes, R.J., Chalchal, H., Shapiro, J.D., Robitaille, S., Price, T.J., Shepherd, L., Au, H.-J., Langer, C., Moore, M.J. & Zalberg, J.R. (2008) *K-RAS* mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 359 (17), p.pp.1757–1765. Available from: [Accessed 26 March 2010].

Khambata-Ford, S., Garrett, C.R., Meropol, N.J., Basik, M., Harbison, C.T., Wu, S., Wong, T.W., Huang, X., Takimoto, C.H., Godwin, A.K., Tan, B.R., Krishnamurthi, S.S., Burris, H.A., 3rd, Poplin, E.A., Hidalgo, M., Baselga, J., Clark, E.A. & Mauro, D.J. (2007) Expression of epiregulin and amphiregulin and *K-RAS* mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25 (22), p.pp.3230–3237.

Kim, H., Jen, J., Vogelstein, B. & Hamilton, S. R. (1994) Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *The American Journal of Pathology*, 145 (1),

p.pp.148–156. Available from: [Accessed 15 December 2012].

Kim, M.-J., Lee, H.S., Kim, J.H., Kim, Y.J., Kwon, J.H., Lee, J.-O., Bang, S.-M., Park, K.U., Kim, D.-W., Kang, S.-B., Kim, J.-S., Lee, J.S. & Lee, K.-W. (2012) Different metastatic pattern according to the *KRAS* mutational status and site-specific discordance of *KRAS* status in patients with colorectal cancer. *BMC cancer*, 12 (1), p.p.347.

Kinzler, Kenneth W & Vogelstein, Bert (1996) Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. *Cell*, 87 (2), p.pp.159–170. Available from: [Accessed 17 December 2012].

Kipp, B.R., Barr Fritcher, E.G., Clayton, A.C., Gores, G.J., Roberts, L.R., Zhang, J., Levy, M.J. & Halling, K.C. (2010) Comparison of *KRAS* Mutation Analysis and FISH for Detecting Pancreatobiliary Tract Cancer in Cytology Specimens Collected During Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 12 (6), p.pp.780–786. Available from: [Accessed 25 January 2013].

Klaus, A. & Birchmeier, W. (2008) Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 8 (5), p.pp.387–398. Available from: [Accessed 5 February 2013].

Klein, C.A. (2009) Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nature Reviews. Cancer*, 9 (4), p.pp.302–312. Available from: [Accessed 10 October 2010].

Knijn, N., Mekenkamp, L.J.M., Klomp, M., Vink-Börger, M E, Tol, J, Teerenstra, S., Meijer, J.W.R., Tebar, M., Riemersma, S., Van Krieken, J H J M, Punt, C J A & Nagtegaal, I D (2011) *KRAS* mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients. *British Journal of Cancer*, 104 (6), p.pp.1020–1026. Available from: [Accessed 3 August 2011].

- Kolch, W. (2000) Meaningful relationships: the regulation of the *RAS/Raf/MEK/ERK* pathway by protein interactions. *The Biochemical journal*, 351 Pt 2, p.pp.289–305.
- Kolligs, F.T., Crispin, A., Munte, A., Wagner, A., Mansmann, U. & Göke, B. (2011) Risk of Advanced Colorectal Neoplasia According to Age and Gender. *PLoS ONE*, 6 (5), p.p.e20076. Available from: [Accessed 14 December 2012].
- Van Krieken, J H J M, Jung, A, Kirchner, T, Carneiro, F., Seruca, R., Bosman, F.T., Quirke, P, Fléjou, J.F., Plato Hansen, T., De Hertogh, G., Jares, P., Langner, C., Hoeffler, G., Ligtenberg, M., Tiniakos, D., Tejpar, S, Bevilacqua, G. & Ensari, A. (2008) *KRAS* mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, 453 (5), p.pp.417–431. Available from: [Accessed 19 May 2010].
- Lamy, Aude, Blanchard, France, Le Pessot, Florence, Sesboué, Richard, Di Fiore, Frédéric, Bossut, J., Fiant, E., Frébourg, T. & Sabourin, J.-C. (2011) Metastatic colorectal cancer *KRAS* genotyping in routine practice: results and pitfalls. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 24 (8), p.pp.1090–1100. Available from: [Accessed 21 August 2011].
- Levin, B., Lieberman, D.A., McFarland, B., Smith, R.A., Brooks, D., Andrews, K.S., Dash, C., Giardiello, F.M., Glick, S. & Levin, T.R. (2008) Screening and Surveillance for the Early Detection of Colorectal Cancer and Adenomatous Polyps, 2008: A Joint Guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology\*†. *CA: a cancer journal for clinicians*, 58 (3), p.pp.130–160. Available from: [Accessed 16 December 2012].
- Lieberman DA, P.S. (2003) Risk factors for advanced colonic neoplasia and hyperplastic polyps in asymptomatic individuals. *JAMA: The Journal of the*



- American Medical Association*, 290 (22), p.pp.2959–2967. Available from: [Accessed 14 December 2012].
- Lièvre, A., Bachet, J.-B., Le Corre, D., Boige, V., Landi, B., Emile, J.-F., Côté, J.-F., Tomasic, G., Penna, C., Ducreux, M., Rougier, P., Penault-Llorca, F. & Laurent-Puig, P. (2006) *KRAS* mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Research*, 66 (8), p.pp.3992–3995. Available from: [Accessed 17 August 2011].
- Long, G.V., Menzies, A.M., Nagrial, A.M., Haydu, L.E., Hamilton, A.L., Mann, G.J., Hughes, T.M., Thompson, J.F., Scolyer, R.A. & Kefford, R.F. (2011) Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic *BRAF* in metastatic melanoma. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29 (10), p.pp.1239–1246.
- Losi, L., Baisse, B., Bouzourene, H. & Benhattar, J. (2005) Evolution of intratumoral genetic heterogeneity during colorectal cancer progression. *Carcinogenesis*, 26 (5), p.pp.916–922. Available from: [Accessed 19 September 2011].
- Loupakis, F., Ruzzo, A., Cremolini, C., Vincenzi, B., Salvatore, L., Santini, D., Masi, G., Stasi, I., Canestrari, E., Rulli, E., Floriani, I., Bencardino, K., Galluccio, N., Catalano, V., Tonini, G., Magnani, M., Fontanini, G., Basolo, F., Falcone, A & Graziano, F (2009) *KRAS* codon 61, 146 and *BRAF* mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in *KRAS* codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 101 (4), p.pp.715–721. Available from: [Accessed 17 August 2011].
- Lynch, H.T., Smyrk, T.C., Watson, P., Lanspa, S.J., Lynch, J.F., Lynch, P.M., Cavalieri, R.J. & Boland, C.R. (1993) Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology*, 104 (5), p.pp.1535–1549.
- Lynch, J.P. & Hoops, T.C. (2002) The genetic pathogenesis of colorectal cancer. *Hematology/oncology clinics of North America*, 16 (4), p.pp.775–810.

- Macedo, M.P., Andrade, L.D.B., Coudry, R., Crespo, R., Gomes, M., Lisboa, B.C.G., Aguiar, S., Jr, Soares, F.A., Carraro, D.M. & Cunha, I.W. (2011) Multiple mutations in the *KRAS* gene in colorectal cancer: review of the literature with two case reports. *International Journal of Colorectal Disease*. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21603900>> [Accessed 24 August 2011].
- Malapelle, U., Carlomagno, C., Salatiello, M., De Stefano, A., De Luca, C., Bianco, R., Marciano, R., Cimminiello, C., Bellevicine, C., De Placido, S. & Troncone, G. (2012) *KRAS* mutation detection by high-resolution melting analysis significantly predicts clinical benefit of cetuximab in metastatic colorectal cancer. *British journal of cancer*, 107 (4), p.pp.626–631.
- Malumbres, M. & Barbacid, M. (2003) *RAS* oncogenes: the first 30 years. *Nature reviews. Cancer*, 3 (6), p.pp.459–465.
- Mariani, P., Lae, M., Degeorges, A., Cacheux, W., Lappartient, E., Margogne, A., Pierga, J.-Y., Girre, V., Mignot, L., Falcou, M.C., Salmon, R.-J., Delattre, O. & De Cremoux, P. (2010) Concordant analysis of *KRAS* status in primary colon carcinoma and matched metastasis. *Anticancer Research*, 30 (10), p.pp.4229–4235. Available from: [Accessed 3 August 2011].
- Mayer, A., Takimoto, M., Fritz, E., Schellander, G., Kofler, K. & Ludwig, H (1993) The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and *mdr* gene expression in colorectal cancer. *Cancer*, 71 (8), p.pp.2454–2460.
- McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Abrams, S.L., Lee, J.T., Chang, F., Bertrand, F.E., Navolanic, P.M., Terrian, D.M., Franklin, R.A., D'Assoro, A.B., Salisbury, J.L., Mazzarino, M.C., Stivala, F. & Libra, M. (2006) Roles of the transformation and drug resistance. *Advances in enzyme regulation*, 46, p.pp.249–279.

- Mendelsohn, J. & Baselga, J. (2006) Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Seminars in oncology*, 33 (4), p.pp.369–385.
- Meyerhardt, J.A. & Mayer, R.J. (2005) Systemic therapy for colorectal cancer. *The New England journal of medicine*, 352 (5), p.pp.476–487.
- Minamoto, T., Yamashita, N., Ochiai, A., Mai, M., Sugimura, T., Ronai, Z. & Esumi, H. (1995) Mutant K-*RAS* in apparently normal mucosa of colorectal cancer patients. Its potential as a biomarker of colorectal tumorigenesis. *Cancer*, 75 (6 Suppl), p.pp.1520–1526.
- Molinari, F., Felicioni, L., Buscarino, M., De Dosso, S., Buttitta, F., Malatesta, S., Movilia, A., Luoni, M., Boldorini, R., Alabiso, O., Girlando, S., Soini, B., Spitale, A., Di Nicolantonio, F., Saletti, P., Crippa, S., Mazzucchelli, L., Marchetti, A., Bardelli, A. & Frattini, M. (2011) Increased detection sensitivity for *KRAS* mutations enhances the prediction of anti-EGFR monoclonal antibody resistance in metastatic colorectal cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17 (14), p.pp.4901–4914.
- Moodie, S.A. & Wolfman, A. (1994) The 3Rs of life: *RAS*, Raf and growth regulation. *Trends in genetics: TIG*, 10 (2), p.pp.44–48.
- Morin, P.J., Sparks, A.B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B & Kinzler, K W (1997) Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science (New York, N.Y.)*, 275 (5307), p.pp.1787–1790.
- Muto, T., Bussey, H.J. & Morson, B.C. (1975) The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer*, 36 (6), p.pp.2251–2270.
- Namba, H., Nakashima, M., Hayashi, T., Hayashida, N., Maeda, S., Rogounovitch, T.I., Ohtsuru, A., Saenko, V.A., Kanematsu, T. & Yamashita, S. (2003) Clinical implication of hot spot *BRAF* mutation, V599E, in

- papillary thyroid cancers. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 88 (9), p.pp.4393–4397.
- Nash, G.M., Gimbel, M., Shia, J., Nathanson, D.R., Ndubuisi, M.I., Zeng, Z.- S., Kemeny, N. & Paty, P.B. (2010) *KRAS* mutation correlates with accelerated metastatic progression in patients with colorectal liver metastases. *Annals of surgical oncology*, 17 (2), p.pp.572–578.
- Nelson, M.A., Wymer, J. & Clements, N., Jr (1996) Detection of K-*RAS* gene mutations in non-neoplastic lung tissue and lung cancers. *Cancer letters*, 103 (1), p.pp.115–121.
- Neumann, J., Zeindl-Eberhart, E., Kirchner, Thomas & Jung, Andreas (2009) Frequency and type of *KRAS* mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathology, Research and Practice*, 205 (12), p.pp.858–862. Available from: [Accessed 2 September 2011].
- Nicholson, R.I., Gee, J.M. & Harper, M.E. (2001) EGFR and cancer prognosis. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, 37 Suppl 4, p.pp.S9–15.
- Di Nicolantonio, F., Martini, M., Molinari, F., Sartore-Bianchi, A., Arena, S., Saletti, P., De Dosso, S., Mazzucchelli, L., Frattini, M., Siena, S. & Bardelli, A. (2008) Wild-type *BRAF* is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26 (35), p.pp.5705–5712. Available from: [Accessed 27 March 2010].
- O’Connell, J.B., Maggard, M.A. & Ko, C.Y. (2004) Colon Cancer Survival Rates With the New American Joint Committee on Cancer Sixth Edition Staging. *Journal of the National Cancer Institute*, 96 (19), p.pp.1420–1425. Available from: [Accessed 15 January 2013].
- Oda, K., Matsuoka, Y., Funahashi, A. & Kitano, H. (2005) A comprehensive

- pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Molecular systems biology*, 1, p.p.2005.0010.
- Ogino, S., Kawasaki, T., Brahmandam, M., Yan, L., Cantor, M., Namgyal, C., Mino-Kenudson, M., Lauwers, G.Y., Loda, M. & Fuchs, C.S. (2005) Sensitive sequencing method for *KRAS* mutation detection by Pyrosequencing. *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD*, 7 (3), p.pp.413–421. Available from: [Accessed 6 April 2010].
- Oliveira, C., Velho, S., Moutinho, C., Ferreira, A., Preto, A., Domingo, E., Capelinha, A.F., Duval, A., Hamelin, R., Machado, J.C., Schwartz, S., Jr, Carneiro, F. & Seruca, R. (2007) *KRAS* and *BRAF* oncogenic mutations in MSS colorectal carcinoma progression. *Oncogene*, 26 (1), p.pp.158–163. Available from: [Accessed 21 September 2011].
- Papin, C., Eychène, A., Brunet, A., Pagès, G., Pouyssegur, J., Calothy, G. & Barnier, J.V. (1995) B-Raf protein isoforms interact with and phosphorylate Mek-1 on serine residues 218 and 222. *Oncogene*, 10 (8), p.pp.1647–1651.
- Park, J.H., Han, S.-W., Oh, D.-Y., Im, S.-A., Jeong, S.-Y., Park, K.J., Kim, T.-Y., Bang, Y.-J. & Park, J.-G. (2011) Analysis of *KRAS*, *BRAF*, PTEN, IGF1R, EGFR intron 1 CA status in both primary tumors and paired metastases determining benefit from cetuximab therapy in colon cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21340604>> [Accessed 3 August 2011].
- Peeters, M., Oliner, K.S., Parker, A., Siena, S., Van Cutsem, E., Huang, J., Humblet, Y., Van Laethem, J.-L., André, T., Wietorek, J., Reese, D. & Patterson, S.D. (2013) Massively parallel tumor multigene sequencing to evaluate response to panitumumab in a randomized phase III study of metastatic colorectal cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 19 (7), p.pp.1902–1912.

- Porebska, I., Harlozińska, A. & Bojarowski, T. (2000) Expression of the tyrosine kinase activity growth factor receptors (EGFR, ERB B2, ERB B3) in colorectal adenocarcinomas and adenomas. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 21 (2), p.pp.105–115.
- Pretlow, T.P. (1995) Aberrant crypt foci and k-*RAS* mutations: Earliest recognized players or innocent bystanders in colon carcinogenesis? *Gastroenterology*, 108 (2), p.pp.600–603. Available from: [Accessed 21 September 2011].
- Pretlow, T.P., BRASitus, T.A., Fulton, N.C., Cheyer, C. & Kaplan, E.L. (1993) K *RAS* Mutations in Putative Preneoplastic Lesions in Human Colon. *Journal of the National Cancer Institute*, 85 (24), p.pp.2004–2007. Available from: [Accessed 17 December 2012].
- Querings, S., Altmüller, J., Ansén, S., Zander, T., Seidel, D., Gabler, F., Peifer, M., Markert, E., Stemshorn, K., Timmermann, B., Saal, B., Klose, S., Ernestus, K., Scheffler, M., Engel-Riedel, W., Stoelben, E., Brambilla, E., Wolf, J., Nürnberg, P. & Thomas, R.K. (2011) Benchmarking of mutation diagnostics in clinical lung cancer specimens. *PloS one*, 6 (5), p.p.e19601.
- Rajagopalan, H., Bardelli, A., Lengauer, C., Kinzler, Kenneth W, Vogelstein, Bert & Velculescu, V.E. (2002a) Tumorigenesis: RAF/*RAS* oncogenes and mismatch-repair status. *Nature*, 418 (6901), p.p.934. Available from: [Accessed 27 August 2012].
- Rajagopalan, H., Bardelli, A., Lengauer, C., Kinzler, Kenneth W, Vogelstein, Bert & Velculescu, V.E. (2002b) Tumorigenesis: RAF/*RAS* oncogenes and mismatch-repair status. *Nature*, 418 (6901), p.p.934. Available from: [Accessed 1 April 2010].
- Richman, S.D., Chambers, P., Seymour, M.T., Daly, C., Grant, S., Hemmings, G. & Quirke, Philip (2011) Intra-tumoral heterogeneity of *KRAS* and *BRAF* mutation status in patients with advanced colorectal cancer (aCRC) and cost-

effectiveness of multiple sample testing. *Analytical cellular pathology (Amsterdam)*, 34 (1-2), p.pp.61–66.

Richman, S.D., Seymour, M.T., Chambers, P., Elliott, F., Daly, C.L., Meade, A.M., Taylor, G., Barrett, J.H. & Quirke, Philip (2009) *KRAS* and *BRAF* mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not preclude benefit from oxaliplatin or irinotecan: results from the MRC FOCUS trial. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27 (35), p.pp.5931–5937. Available from: [Accessed 19 July 2011].

Riemann, J. & Webendörfer, S. (2012) Darmkrebsmonat März 2012: Männer im Fokus. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 137 (08), p.pp.361–361. Available from: [Accessed 14 December 2012].

Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V *Krebs in Deutschland 2007/2008. Häufigkeiten und Trends*. Berlin, 2012.

Ronaghi, M., Uhlén, M. & Nyren, P. (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science (New York, N.Y.)*, 281 (5375), p.pp.363, 365. Available from: [Accessed 20 May 2011].

De Roock, W, Piessevaux, H, De Schutter, J, Janssens, M., De Hertogh, G., Personeni, N., Biesmans, B, Van Laethem, J-L, Peeters, M, Humblet, Y, Van Cutsem, E & Tejpar, S (2008) *KRAS* wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 19 (3), p.pp.508–515. Available from: [Accessed 17 August 2011].

De Roock, Wendy, Claes, B., Bernasconi, D., De Schutter, Jef, Biesmans, Bart, Fountzilas, G., KalogeRAS, K.T., Kotoula, V., Papamichael, D., Laurent-Puig, P., Penault-Llorca, F., Rougier, P., Vincenzi, Bruno, Santini, Daniele,

- Tonini, Giuseppe, Cappuzzo, F., Frattini, M., Molinari, F., Saletti, P., De Dosso, S., Martini, M., Bardelli, A., Siena, S., Sartore-Bianchi, A., Tabernero, J., Macarulla, T., Di Fiore, Frédéric, Gangloff, A.O., Ciardiello, F., Pfeiffer, P., Qvortrup, C., Hansen, T.P., Van Cutsem, Eric, Piessevaux, Hubert, Lambrechts, D., Delorenzi, M. & Tejpar, Sabine (2010) Effects of *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, and *PIK3CA* mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *The lancet oncology*, 11 (8), p.pp.753–762.
- De Roock, Wendy, Jonker, D.J., Di Nicolantonio, F., Sartore-Bianchi, A., Tu, D., Siena, S., Lamba, S., Arena, S., Frattini, M., Piessevaux, Hubert, Van Cutsem, Eric, O’Callaghan, C.J., Khambata-Ford, S., Zalcberg, J.R., Simes, J., Karapetis, C.S., Bardelli, A. & Tejpar, Sabine (2010) Association of *KRAS* p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 304 (16), p.pp.1812–1820. Available from: [Accessed 29 August 2012].
- Sailer, M. (2012) Diagnostik und Screening. *coloproctology*, 34 (1), p.pp.31–41. Available from: [Accessed 14 December 2012].
- Saltz, L.B., Meropol, N.J., Loehrer, P.J., Sr, Needle, M.N., Kopit, J. & Mayer, R.J. (2004) Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 22 (7), p.pp.1201–1208.
- Santini, Daniele, Galluzzo, S., Gaeta, L., Zoccoli, A., Riva, E., Ruzzo, Annamaria, Vincenzi, Bruno, Graziano, Francesco, Loupakis, Fotios, Falcone, Alfredo, Munda, A.O. & Tonini, Giuseppe (2011) Should oncologists be aware in their clinical practice of *KRAS* molecular analysis? *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29 (8), p.pp.e206–207; author reply e208–209.



- Santini, Daniele, Loupakis, Fotios, Vincenzi, Bruno, Floriani, Irene, Stasi, Irene, Canestrari, Emanuele, Rulli, Eliana, Maltese, P.E., Andreoni, F., Masi, Gianluca, Graziano, Francesco, Baldi, G.G., Salvatore, Lisa, Russo, A., Perrone, G., Tommasino, M.R., Magnani, Mauro, Falcone, Alfredo, Tonini, Giuseppe & Ruzzo, Annamaria (2008) High concordance of *KRAS* status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. *The Oncologist*, 13 (12), p.pp.1270–1275. Available from: [Accessed 25 March 2010].
- Schubbert, S., Shannon, K. & Bollag, G. (2007) Hyperactive *RAS* in developmental disorders and cancer. *Nature reviews. Cancer*, 7 (4), p.pp.295–308.
- Singer, G., Oldt, R., 3rd, Cohen, Y., Wang, B.G., Sidransky, D., Kurman, R.J. & Shih, I.-M. (2003) Mutations in *BRAF* and *KRAS* characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 95 (6), p.pp.484–486.
- Smith, K.J., Johnson, K.A., Bryan, T.M., Hill, D.E., Markowitz, S., Willson, J.K., PaRASkeva, C., Petersen, G.M., Hamilton, S R & Vogelstein, B (1993) The APC gene product in normal and tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 (7), p.pp.2846–2850.
- Suzuki, Y., Orita, M., Shiraishi, M., Hayashi, K. & Sekiya, T. (1990) Detection of *RAS* gene mutations in human lung cancers by single-strand conformation polymorphism analysis of polymeRASe chain reaction products. *Oncogene*, 5 (7), p.pp.1037–1043.
- Tol, Jolien, Dijkstra, J.R., Vink-Börger, Marianne E, Nagtegaal, Iris D, Punt, Cornelis J A, Van Krieken, Johan H J M & Ligtenberg, M.J.L. (2010) High sensitivity of both sequencing and real-time PCR analysis of *KRAS* mutations in colorectal cancer tissue. *Journal of cellular and molecular medicine*, 14 (8), p.pp.2122–2131.

- Tol, Jolien, Nagtegaal, Iris D & Punt, Cornelis J A (2009) *BRAF* mutation in metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*, 361 (1), p.pp.98–99. Available from: [Accessed 19 September 2012].
- Tórtola, S., Steinert, R., Hantschick, M., Peinado, M.A., Gastinger, I., Stosiek, P., Lippert, H., Schlegel, W. & Reymond, M.A. (2001) Discordance between K-*RAS* mutations in bone marrow micrometastases and the primary tumor in colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 19 (11), p.pp.2837–2843. Available from: [Accessed 21 September 2011].
- Vasen, H.F., Watson, P., Mecklin, J.P. & Lynch, H.T. (1999) New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology*, 116 (6), p.pp.1453–1456.
- Vaughn, C.P., Zobell, S.D., Furtado, L.V., Baker, C.L. & Samowitz, W.S. (2011) Frequency of *KRAS*, *BRAF*, and *NRAS* mutations in colorectal cancer. *Genes, chromosomes & cancer*, 50 (5), p.pp.307–312.
- Vogelstein, B, Fearon, E.R., Hamilton, S R, Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M. & Bos, J.L. (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *The New England Journal of Medicine*, 319 (9), p.pp.525–532. Available from: [Accessed 28 July 2011].
- Vogelstein, B & Kinzler, K W (1999) Digital PCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (16), p.pp.9236–9241.
- Wan, P.T.C., Garnett, M.J., Roe, S.M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V.M., Jones, C.M., Marshall, C.J., Springer, C.J., Barford, D. & Marais, R. (2004) Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*, 116 (6), p.pp.855–867. Available from:

[Accessed 27 March 2010].

Watanabe, T., Kobunai, T., Yamamoto, Y., Matsuda, K., Ishihara, S., Nozawa, K., Iinuma, H., Shibuya, H. & Eshima, K. (2011) Heterogeneity of *KRAS* Status May Explain the Subset of Discordant *KRAS* Status Between Primary and Metastatic Colorectal Cancer. *Diseases of the Colon and Rectum*, 54 (9), p.pp.1170–1178. Available from: [Accessed 11 August 2011].

Weichert, W., Schewe, C., Lehmann, A., Sers, C., Denkert, C., Budczies, J., Stenzinger, A., Joos, H., Landt, O., Heiser, V., Röcken, C. & Dietel, M. (2010) *KRAS* genotyping of paraffin-embedded colorectal cancer tissue in routine diagnostics: comparison of methods and impact of histology. *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD*, 12 (1), p.pp.35–42. Available from: [Accessed 2 September 2011].

Xing, M. (2005) *BRAF* mutation in thyroid cancer. *Endocrine-related cancer*, 12 (2), p.pp.245–262.

Yarden, Y. & Schlessinger, J. (1987) Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor. *Biochemistry*, 26 (5), p.pp.1443–1451.

Zauber, P., Sabbath-Solitare, M., Marotta, S.P. & Bishop, D.T. (2003) Molecular changes in the *Ki-RAS* and *APC* genes in primary colorectal carcinoma and synchronous metastases compared with the findings in accompanying adenomas. *Molecular pathology: MP*, 56 (3), p.pp.137–140.

Zhu, D., Keohavong, P., Finkelstein, S.D., Swalsky, P., Bakker, A., Weissfeld, J., Srivastava, S. & Whiteside, T.L. (1997) *K-RAS* Gene Mutations in Normal Colorectal Tissues from *K-RAS* Mutation-positive Colorectal Cancer Patients. *Cancer Res*, 57 (12), p.pp.2485–2492. Available from: [Accessed 31 March 2010].